

Charakterisierung der Funktion und Lokalisation der plastidären Genexpressionsmaschinerie in *Nicotiana tabacum*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Sabrina Finster

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
Prof. Dr. Richard Lucius

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber
2. Prof. Dr. Bernhard Grimm
3. Prof. Dr. Thomas Pfannschmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 2014

*Jede Lösung eines Problems
ist ein neues Problem.*

*Johann Wolfgang von Goethe
(1749-1832)*

Zusammenfassung

Die Transkription der Chloroplasten heutiger Landpflanzen ist erstaunlich komplex. Das relativ kleine Genom der Plastiden, welches für Komponenten der Photosynthese und der eigenen Genexpressionsmaschine kodiert, wird mindestens durch zwei RNA Polymerasen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft transkribiert. Neben der plastidär kodierten RNA Polymerase (plastid-encoded plastid RNA polymerase, PEP), existiert mindestens eine weitere kernkodierte RNA Polymerase (nuclear-encoded plastid RNA polymerase, NEP). Die PEP spielt eine wichtige Rolle bei der Expression der Photosynthesegene und ist essentiell für die Biogenese der Chloroplasten und schließlich für das Überleben der Pflanzen.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals die spezifische Interaktion der PEP mit ihren Transkriptionseinheiten unter verschiedenen Lichtbedingungen *in vivo* auf plastomweiter Ebene gezeigt. Darunter befinden sich hauptsächlich DNA Fragmente, die Photosynthesegene (*psbA*, *psbC*, *psbD*, *rbcL*) repräsentieren. Außerdem zeigt die PEP eine eindeutige Präferenz zu den rRNA Genen und einigen tRNA Genen. Eine Reduktion dieser Assoziation der PEP in Dunkelperioden lässt einen lichtabhängigen Prozess bei der PEP-DNA Assoziation vermuten. Um einen Einblick in die PEP Aktivität an den bestimmten DNA Regionen *in vivo* zu erhalten, wurde die Assoziation zu naszierenden Transkripten untersucht. Zwar konnte ein Großteil der chloroplastidären RNA Spezies mit der PEP koprizipitiert werden, aber sie scheint präferentiell mit tRNAs zu interagieren.

Die Analyse der suborganellären Verteilung der PEP bewies erstmals, dass die Polymerase hauptsächlich mit den Chloroplastenmembranen assoziiert. Dort befindet sich auch das „transkriptionsaktive Chromosom“ (*transcriptionally active chromosome*, TAC). Im TAC und verwandten Aufreinigungen wurden vor kurzem neben der PEP auch Mitglieder verschiedenster RNA Prozessierungsfaktoren identifiziert, was auf eine mögliche Kopplung von Transkription und posttranskriptionellen Prozessen hindeutet. Um einen Einblick in dieses Interaktionsnetzwerk zu erhalten, wurden Transkriptanalysen des TACs ausgeführt. Mit wenigen Ausnahmen assoziieren alle plastidären RNA Spezies mit dem TAC. Einige RNAs liegen bereits prozessiert vor, was eine Verbindung zwischen Transkription und posttranskriptionellen Prozessen noch im TAC vermuten lässt.

Schlagworte: Chloroplast, PEP, RpoA, TAC, Transkription, *Microarray*

Abstract

Chloroplast transcription in landplants is astonishingly complex. The relative small genome of plastids, which codes for components of the photosynthetic machinery as well as for components of their own gene expression machinery, is transcribed by at least two different RNA polymerases of different phylogenetic origin. Beside the plastid-encoded plastid RNA polymerase (PEP) a nuclear-encoded plastid RNA polymerase (NEP) exists as well. PEP plays a major role in the expression of photosynthesis genes and is essential for chloroplast biogenesis and thus for plant survival.

This work shows the specific *in vivo* interaction between PEP and its transcription units under different light conditions on a plastome-wide scale. Among them are DNA fragments that represent photosynthetic genes (*psbA*, *psbC*, *psbD*, *rbcL*). In addition, PEP shows clear preferences to rRNA and tRNA genes. Furthermore, the association of PEP with photosynthesis-related genes was reduced during the dark period, indicating that PEP-DNA association is a light-dependent process. To survey PEP activity *in vivo* on plastid DNA regions, the association to nascent transcripts was analyzed. The majority of plastid RNA species could be found in PEP precipitates, but PEP seems to interact more strongly with tRNAs.

Analysis of the suborganellar distribution of PEP shows that PEP is preferably associated with chloroplast membranes. The transcriptionally active chromosome (TAC) was also found to be membrane-attached. Beside PEP different RNA processing factors were identified within the TAC and related purifications, indicating a possible coupling of transcription and posttranscriptional processes. To gain more insights into this interaction network, transcripts of TAC were analyzed. It is shown that nearly all plastid RNA species with only a few exceptions are associated to the TAC and that at least selected transcripts are already processed. This indicates that there is a link between transcription and posttranscriptional processes already within the TAC.

keywords: chloroplast, PEP, RpoA, TAC, transcription, microarray

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Das genetische System: Der Chloroplast.....	1
1.1.1 Evolutionärer Ursprung von Plastiden	1
1.1.2 Organisation und Struktur des Plastidengenoms.....	2
1.2 Transkriptionsapparat des Chloroplasten.....	5
1.2.1 Transkription: Bakterien versus Chloroplasten	5
1.2.2 Plastidäre RNA Polymerasen	7
1.2.2.1 Die plastidär kodierte plastidäre RNA Polymerase (PEP) .	7
1.2.2.2 Kernkodierte plastidäre RNA Polymerase (NEP)	10
1.2.3 Plastidäre Promotoren.....	11
1.2.3.1 Struktur und Sequenz der PEP Promotoren.....	11
1.2.3.2 Struktur und Sequenz der NEP Promotoren	11
1.2.4 Zusammenspiel von PEP und NEP	12
1.2.5 Einblick in die Transkription der Plastiden mittels ChIP-on-Chip.....	13
1.2.6 Regulation der plastidären Transkription	16
1.2.6.1 Veränderung der Transkriptionsaktivität plastidärer Gene	16
1.2.6.2 Dynamik des PEP Komplexes.....	17
1.3 Posttranskriptionelle Prozesse	18
1.3.1 Prozessierung, Stabilität und Degradation	18
1.3.2 Spleißen	19
1.3.3 Edierung	20
1.4 Translation	22
1.5 Kopplung der Transkription mit den posttranskriptionellen Prozessen	23
1.6 Zielstellung.....	25
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	27
2.1.2 Bakterienstamm.....	27
2.1.3 Antikörper und Oligonukleotide	27
2.1.4 Chemikalien und Standardlösungen.....	27
2.1.5 Medien.....	28

2.1.5.1 Pflanzenmedien.....	28
2.1.5.2 Bakterienmedien	28
2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.7 Sonstige Materialien	29
2.2 Methoden.....	29
2.2.1 Pflanzenanzucht.....	29
2.2.2 Sterilisation von Tabaksamen	30
2.2.3 Transformation von Plastiden.....	30
2.2.4 Isolation von Proteinen	31
2.2.5 Elektrophorese und Transfer von Proteinen	31
2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.2.5.2 Transfer von Proteinen (Western Transfer).....	32
2.2.6 Immunodetektion	32
2.2.7 Isolation von Nukleinsäuren	33
2.2.7.1 Extraktion von DNA.....	33
2.2.7.2 Extraktion von RNA.....	33
2.2.7.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Chloroplasten	34
2.2.7.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus dem TAC.....	34
2.2.7.5 Extraktion von Plasmiden.....	34
2.2.7.6 Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren	35
2.2.7.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	35
2.2.8 Elektrophorese und Transfer von Nukeinsäuren	35
2.2.8.1 DNA Gelelektrophorese	35
2.2.8.2 Transfer von DNA (Southern Transfer)	36
2.2.8.3 RNA Gelelektrophorese	36
2.2.8.4 Transfer von RNA (Northern Transfer).....	37
2.2.9 Markierung, Hybridisierung und Detektion von DNA Sonden	38
2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	38
2.2.11 Chloroplastenisolation und Extraktion der Membranfraktion .	38
2.2.12 DNaseI Behandlung von Chloroplastenmembranen.....	39
2.2.13 Immunopräzipitation und <i>Microarray</i> Analyse (ChIP-on-chip, RIP-Chip).....	40
2.2.13.1 Immunopräzipitation	40
2.2.13.2 Herstellung eines Plastom überspannenden <i>Microarrays</i> (<i>Tiling-Array</i>)	41
2.2.13.3 Extraktion von DNA bzw. RNA aus Immunopräzipitaten ...	41
2.2.13.4 Fluoreszenzmarkierung.....	41
2.2.13.5 Hybridisierung und Auswertung von <i>Microarrays</i>	42
2.2.13.6 <i>Microarray</i> Analysen mit RNA aus TAC-Extrakten	42

2.2.14 Dotblot Analysen	43
2.2.15 Reverse Transkription	43
3. Ergebnisse	44
3.1 Charakterisierung und Lokalisation der plastidären Transkriptions- und Translationsmaschinerie	44
3.1.1 Markierung von <i>rpoA</i> mit einer HA-Epitopsequenz.....	44
3.1.2 Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen	45
3.1.3 Phänotyp der homoplastomischen RpoA:HA Pflanzen.....	48
3.1.4 Entwicklungsabhängige Expression von RpoA:HA.....	48
3.1.5 RpoA lokalisiert in den Membranen der Chloroplasten.....	51
3.1.6 DNA-unabhängige Membranassoziation in jungem Gewebe	53
3.1.7 Die PEP Kernuntereinheiten assoziieren mit RpoA:HA	55
3.1.8 Immunopräzipitation von RpoA:HA.....	57
3.1.9 Identifikation von PEP assoziierten DNA Regionen mittels ChIP-on-Chip.....	60
3.1.9.1 PEP-assozierte DNA unter Lichtbedingungen	60
3.1.9.2 Selektive Reduktion der DNA Assoziation von PEP im Dunkeln	62
3.1.10 Identifikation RpoA:HA-assoziierter RNAs mittels RIP-Chip..	65
3.1.11 Epitopmarkierung von <i>rpoC2</i> und <i>rps2</i>	70
3.2 Charakterisierung Nukleoid-assoziierter RNAs	73
3.2.1 Viele plastidäre mRNAs sind mit dem TAC-Komplex assoziiert	74
3.2.2 Der Kern chloroplastidärer Nukleole enthält prozessierte RNA.....	78
3.2.2.1 Spleißstatus von <i>atpF</i>	79
3.2.2.2 Edierungsanalysen.....	82
4. Diskussion	85
4.1 Qualitativ neue Erkenntnisse über die PEP durch die Anwendung der ChIP-on-Chip Technik.....	85
4.1.1 Präzipitation von PEP-Holokomplexen	87
4.1.2 PEP assoziiert mit weiten Bereichen des Chloroplastengenoms: weitestgehende Bestätigung genetischer Analysen	87
4.2 Lichtaktivierte Assoziation von PEP mit ausgewählten DNA Regionen	89
4.2.1 Dunkelaktivierte Assoziation von PEP mit wenigen Genen ...	90
4.2.2 Wie wird die PEP-DNA Assoziation reguliert?.....	91
4.3 Die PEP assoziiert hauptsächlich mit den abundantesten mRNAs und vielen tRNAs	92

4.3.1 Die RIP-Chip Technik ist ein geeignetes Werkzeug zur Identifikation aktiv transkribierter RNA durch die PEP	92
4.3.2 Die PEP ist besonders stark mit <i>psbA</i> und <i>rbcL</i> assoziiert....	92
4.3.3 tRNAs sind präferentiell mit der PEP assoziiert.....	94
4.3.4 Besondere Bedeutung der PEP für die Expression plastidärer tRNAs	98
4.3.4.1 Ist der Phänotyp von PEP Nullmutanten eine Folge reduzierter Translation?	99
4.3.4.2 Frühe Akkumulation der PEP in der Tabakentwicklung.....	100
4.4 Membrananker für die PEP	100
4.5 Kopplung Transkription und posttranskriptionaler Prozesse	102
4.5.1 Viele plastidäre RNAs assoziieren mit dem TAC.....	102
4.5.2 Der TAC-Komplex enthält prozessierte RNA.....	104
4.5.2.1 RNAs des TACs sind bereits gespleißt	104
4.5.2.2 Einige Transkripte liegen bereits ediert im TAC vor	106
4.6 Funktionsverlust von <i>rps2</i> durch Epitopmarkierungen	108
4.7 Ausblick.....	109
Literatur	110
Anhang 1	138
Anhang 2	140
Abkürzungen.....	VII
Danksagung	XIII
Eigenständigkeitserklärung.....	XIV

1. Einleitung

Eine typische Pflanzenzelle besitzt drei genetische Systeme, je eines im Zellkern, in den Mitochondrien und in den Plastiden. Im Folgenden wird näher auf den zuletzt genannten Plastiden eingegangen, der als membranumschlossener Körper zu den sogenannten Organellen im Cytoplasma zählt. Plastiden gehen aus den Proplastiden hervor, welche sich in eine Vielzahl von Derivaten differenzieren können (Waters und Pyke 2004), wobei die Chloroplasten zu den wohl bekanntesten unter den Plastiden zählen. Sie stellen die Orte der Photosynthese dar, bei der Licht in chemische Energie und atmosphärisches Kohlendioxid in Kohlenhydrate verarbeitet wird (zusammengefasst in Finkemeier 2010, Lyska *et al.* 2013). Die Entdeckung von DNA Molekülen in Chloroplasten (Sager und Ishida 1963) führte seit den 70iger Jahren zu einem Wettrennen um die Entschlüsselung ihres genetischen Inhalts (Maier *et al.* 2008). Heute sind mehr als 300 chloroplastidäre Genome sequenziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=2759&opt=plastid>).

1.1 Das genetische System: Der Chloroplast

1.1.1 Evolutionärer Ursprung von Plastiden

Plastiden und auch Mitochondrien sind aus ehemals frei lebenden Prokaryonten entstanden. Vor 2,5-1,5 Milliarden Jahren sind Mitochondrien wahrscheinlich durch Endosymbiose eines α -Proteobakterium in die Vorläufer heutiger eukaryotischer Zellen aufgenommen worden. Die Entwicklung von Plastiden ging erst später (vor ca. 1,5-1,2 Millionen Jahren) aus einer zweiten endosymbiotischen Beziehung hervor. Anfangs wurde ein freilebender Vorgänger heutiger Cyanobakterien in einen einzelligen, Mitochondrien-tragenden Eukaryoten integriert (Margulis 1970, Kutschera und Niklas 2004, Gould *et al.* 2008).

Im Laufe der Zeit wurden die einst selbstständigen Organismen in Koevolution mit der Wirtszelle zu den heutigen Organellen der Eukaryoten. Diese als Endosymbiontentheorie bezeichnete Hypothese wurde bereits vor mehr als 100 Jahren aufgestellt (Mereschkowsky 1905) und von L. Margulis (1970) modernen Erkenntnissen angepasst. Demnach sind eukaryotische Zellen durch eine Serie von

symbiotischen Ereignissen entstanden und die jeweiligen Komponenten stammen von unterschiedlichen phylogenetischen Linien ab (Gray 1993).

Die Integration eines prokaryotischen Einzellers in eine eukaryotische Wirtszelle zog einen massiven Gentransfer von dem Bakteriengenom in das nukleäre Genom nach sich. Viele der ursprünglichen Gene des prokaryotischen Symbionten gingen verloren, andere gelangten in das Kerngenom und nur wenige verblieben innerhalb des Organells (Palmer und Delwiche 1997, Blanchard und Lynch 2000, Martin 2003). Im Laufe der Jahrtausende reduzierte sich das Genom der prokaryotischen Plastidenvorläufer, welches ursprünglich mehrere tausend Gene kodierte, um das 20-30fache (Palmer 1985, Timmis *et al.* 2004). Dementsprechend wird eine Vielzahl kernkodierter Proteine für die Aufrechterhaltung plastidärer Prozesse (Transkription, Translation, posttranskriptionelle Prozessierung, Photosynthese etc.) posttranslationell vom Zytoplasma in die Chloroplasten importiert (Lopez-Juez und Pyke 2005). Obwohl das Ereignis der Endosymbiose zu einem starken Genverlust und -transfer führte, behalten Chloroplasten einen kleinen Teil ihrer genetischen Autonomie, wie eine eigene Transkriptions- und Translationsmaschinerie. Zusätzlich sind einige Gene, die für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und der Photosynthese essentiell sind, noch auf dem Plastidengenom kodiert. Die koordinierte Expression von kernkodierten und chloroplastidären Genen ist essentiell für die Biogenese und Entwicklung der Chloroplasten (Goldschmidt-Clermont 1998).

1.1.2 Organisation und Struktur des Plastidengenoms

Die Plastideng Genome (Plastome) der heutigen Landpflanzen liegen meist in Form eines zirkulären, doppelsträngigen DNA Moleküls mit einer Größe von 120-190 kb vor (Sugiura 1995, Sugiura *et al.* 1998a). Anders ist die Situation in den Grünalgen, die kleinere oder größere Plastome aufweisen können, z.B. *Codium fragile* mit 85 kb (Hedberg *et al.* 1981) oder *Acetabularia mediterranea* mit 2000 kb (Palmer 1985).

Das Plastom kommt in einer hohen Kopienzahl im Chloroplasten vor und wird mit DNA-Bindeproteinen in so genannten Nukleoiden oder plastidären „Kernen“ organisiert ähnlich wie bei ihren prokaryotischen Vorfahren (Sugiura *et al.* 1998b, Kobayashi *et al.* 2002, Sakai *et al.* 2004). Die Lokalisation und Morphologie der Nukleoide ist speziesspezifisch und hängt auch vom Entwicklungsstand der Plastiden ab (Kuroiwa 1991). Die chloroplastidäre DNA (cpDNA) ist an das Membransystem

der Chloroplasten angeheftet (Mullet 1993, Sato *et al.* 1993, Majeran *et al.* 2012). Während der Umwandlung vom Proplastiden zum Chloroplasten werden die Nukleotide von der Hüllmembran zur Thylakoidmembran transloziert (Sellden und Leech 1981, Majeran *et al.* 2012). Die Nukleotid-assoziierten Proteine haben verschiedene Funktionen in der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Nukleotid-Struktur, der Membranverankerung sowie in der DNA Replikation und sind an der Transkription und den posttranskriptionellen Prozessen beteiligt (Sakai *et al.* 2004, Majeran *et al.* 2012). Der Transkriptionsapparat ist fest mit den Nukleotiden verbunden. So konnte *in vitro* eine Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden, die mit den Nukleotiden verknüpft ist (Sakai *et al.* 1991).

Die Organisation des Plastoms ist zwischen verschiedenen Spezies variabel. Allerdings sind asymmetrisch angeordnete inverse Sequenzwiederholungen, sogenannte *inverted repeats* (IR), unter allen Landpflanzen und einigen Algenarten verbreitet und beinhalten meist den ganzen Satz von rRNA Genen, welche somit als Duplikate vorliegen (Palmer 1985). Die genaue Bedeutung dieser Verdopplung ist noch immer nicht geklärt (Bock 2007). Die Anordnung der *inverted repeats* teilt das chloroplastidäre Genom in einen großen und einen kleinen Einzelkopiebereich (*large* und *small single-copy region*, LSC und SSC, siehe Abb. 1, Palmer 1985, Sugiura 1992).

Das plastidäre Genom kodiert für ungefähr 130 bekannte Gene (Sugita und Sugiura 1996), welche in drei Hauptkategorien geordnet werden können: (i) Gene der Transkription und Translation, (ii) Gene des Photosyntheseapparats und (iii) Gene der Biosynthese von Aminosäuren, Fettsäuren, Pigmenten usw. (Mullet 1993). Die plastidär kodierten Gene sind meist in komplexe Operon-Strukturen organisiert. Oft werden Gene mit gemeinsamer Funktion in diesen kolokalisiert und können Introns enthalten (Sugiura 1992, Mullet 1993).

Das Chloroplastengenom der in dieser Arbeit verwendeten Pflanze *Nicotiana tabacum* weist eine Größe von 155,9 kb auf und beinhaltet 143 Gene, von denen 98 für Proteine, 4 für rRNAs und 37 für tRNAs kodieren (NCBI: NC_001879; siehe Abb.1).

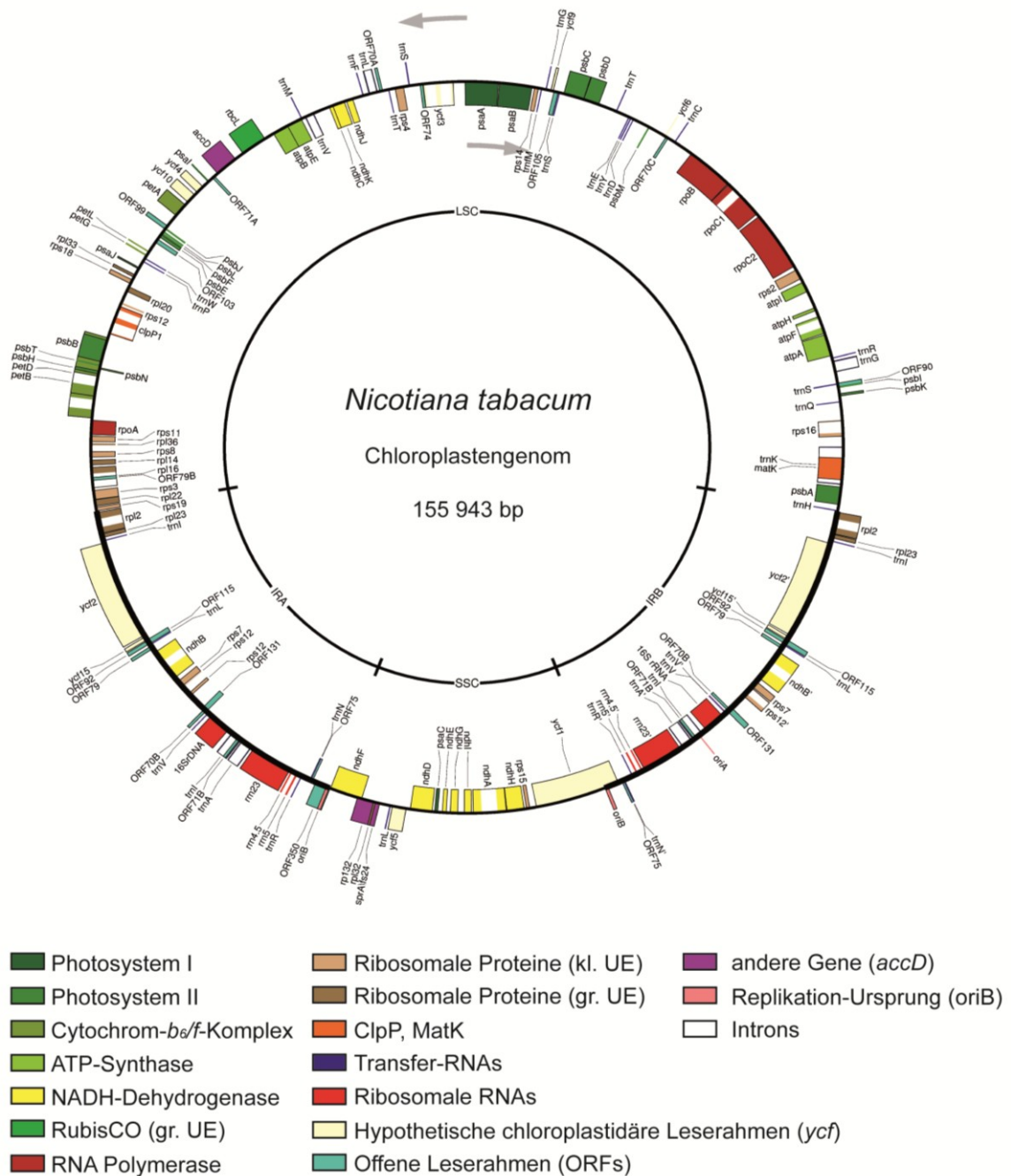


Abb. 1: Genkarte des Tabak Plastoms hergestellt mit OrganelleGenomeDRAW (Lohse *et al.* 2013). Die grauen Pfeile zeigen die Transkriptionsrichtung. IR A und IR B, *inverted repeat* A und B; SSC, *small single copy region*; LSC, *large single copy region*.

1.2 Transkriptionsapparat des Chloroplasten

Obwohl das plastidäre Genom im Vergleich zu seinen prokaryotischen Vorfahren relativ klein ist, so ist die Transkriptionsmaschinerie in den Chloroplasten heutiger Landpflanzen erstaunlich komplex. Cyanobakterien und auch andere Bakterien benötigen eine einzige RNA Polymerase (RNAP) um alle Gene zu transkribieren. Das Minimal- oder Core-Enzym der Cyanobakterien besteht aus mehreren Untereinheiten, die durch die Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* kodiert sind. Zusammen mit einem kernkodierten Sigma-(σ)-Faktor, der eine Rolle bei der Promotorerkennung und der Transkriptionsinitiation spielt, wird dieses Core-Enzym zum Holoenzym komplettiert (Kaneko *et al.* 1996, Liere *et al.* 2011). Cyanobakterien besitzen zwar nur eine RNA Polymerase, dafür ermöglichen aber eine Vielzahl von Sigmafaktoren die Transkription unterschiedlicher Sets von Genen (Imamura *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu nutzen Chloroplasten der Angiospermen, trotz ihres kleineren Genoms verglichen zu ihren bakteriellen Vorfahren, nicht nur mehrere σ -Faktoren, sondern auch verschiedene RNA Polymerasen (Hess und Börner 1999, Liere und Maliga 2001).

1.2.1 Transkription: Bakterien versus Chloroplasten

Bei der Transkription handelt es sich um den Prozess der RNA Synthese durch DNA-abhängige RNA Polymerasen. In allen Organismen wird die Transkription in drei mechanisch und strukturell verschiedene Prozesse geteilt: Initiation, Elongation und Termination (Vassylyev 2009). Die bakterielle Transkription ist bislang am besten untersucht. Bei der Initiation wird die RNAP mittels spezifischer Sigmafaktoren zu den stromaufwärts gelegenen Promotorsequenzen von Genen rekrutiert (Iyer und Aravind 2012). Der σ -Faktor und die RNAP bilden zusammen den basalen Transkriptionsapparat, der für die generelle Transkription benötigt wird (Iyer und Aravind 2012). Genspezifische Aktivierung und Repression wird durch weitere DNA-bindende Transkriptionsfaktoren reguliert, welche aber nicht Teil des Holoenzym sind (RNAP Core- σ -Komplex, Yagi und Shiina 2012). Während der Initiation wird die DNA nahe der Transkriptionsstartstelle in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen und die RNA Synthese beginnt. Die Initiation ist durch mehrere Runden von Synthese-Abbrüchen charakterisiert. Dabei werden zunächst kurze RNA-Produkte synthetisiert

(Bochkareva und Zenkin 2013). Wenn die RNAP ein Molekül mit einer Länge von 13-15 bp generiert hat, kommt es zur Promotorfreisetzung des Transkriptionskomplexes und zum Übergang in die Elongationsphase (Vassilyev *et al.* 2007). Die Elongation ist die längste Phase der Transkription. Hierbei handelt es sich um einen sich ständig wiederholenden mechanisch-chemischen Prozess. Dieser setzt sich zusammen aus einer einzigen NTP-Kondensierungsreaktion, bei der die naszierende RNA durch ein Nukleotidmonophosphat (NMP) verlängert und gleichzeitig Pyrophosphat freigesetzt wird, gefolgt von einer Translokationsreaktion des Enzyms um ein Nukleotid entlang des zu kopierenden DNA-Strangs (Brueckner *et al.* 2009b, Cheung und Cramer 2012, Selth *et al.* 2010). Die RNA Polymerase steht stetig im Kontakt mit ihren Reaktionsprodukten. Bei jedem Zyklus bleibt die RNA an das Enzym gebunden und wird zum Substrat sobald ein neuer Zyklus beginnt. Die naszierende RNA kann mit dem *Template*-Strang der DNA eine Basenpaarung von 8-9 Nukleotiden eingehen, welches als RNA-DNA Hybrid bekannt ist und wahrscheinlich dem Elongationskomplex die nötige Stabilität verleiht (Kireeva *et al.* 2000, Kornberg 2007, Brueckner *et al.* 2009a). Zusätzlich benötigen Bakterien sogenannte Elongationsregulatoren wie z.B. NusA, NusG, Gre-Faktoren (Vassilyev 2009).

Die bakterielle Transkription wird über zwei verschiedene Mechanismen terminiert. Bei der Rho-abhängigen Termination bewirken sogenannte Rho-Faktoren eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum der RNAP und lösen so die Dissoziation der Polymerase von der DNA aus. Bei der Rho-unabhängigen Termination führen dagegen stabile RNA Stammschleifen-Strukturen (auch intrinsische Terminatoren genannt) zu einer solchen Konformationsänderung (Epshtein *et al.* 2007, Epshtein *et al.* 2010).

In Chloroplasten erfolgt die Promotorerkennung ähnlich der in Bakterien (siehe Kap. 1.2.2.1 und 1.2.3.1). Zusätzliche Transkriptionsfaktoren oder DNA-bindende Proteine, die zwischen Bakterien und den Chloroplasten höherer Pflanzen konserviert sind, sind nicht bekannt. Im Gegensatz zur Initiation sind die post-Initiationsschritte in Chloroplasten wenig untersucht. Bisher konnten keine Elongations- und Terminationsfaktoren für plastidäre Polymerasen zweifelsfrei identifiziert werden. Die beiden Proteine pTAC13 (*plastid transcriptionally activ chromosome 13*) und Etched1 (ET1) könnten jedoch an der Regulation der plastidären Elongation beteiligt sein, da sie Ähnlichkeiten zu der NusG-Domäne und dem nukleären

Transkriptionselongationsfaktor TFIIIS aufweisen (da Costa e Silva *et al.* 2004, Pfalz *et al.* 2006).

Die Termination in Chloroplasten ist noch immer nicht aufgeklärt, zeigt aber deutliche Unterschiede zur bakteriellen Transkriptionstermination. Es konnte zwar demonstriert werden, dass die chloroplastidäre RNA Polymerase an intrinsischen bakterien-ähnlichen Terminatoren *in vitro* terminiert (Chen und Orozco 1988). Dennoch werden die 3'-Enden von RNAs durch RNA Prozessierung und nicht durch die Termination an exakten Positionen *in vivo* generiert (Stern und Grissem 1987).

1.2.2 Plastidäre RNA Polymerasen

1.2.2.1 Die plastidär kodierte plastidäre RNA Polymerase (PEP)

Das Plastom der Algen und der höheren Pflanzen beinhaltet die Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, und *rpoC2*, die jeweils für Homologe der Core-Untereinheiten α , β , β' und β'' der multimeren bakteriellen RNA Polymerase kodieren. Diese plastidär kodierte plastidäre RNA Polymerase wird häufig als PEP bezeichnet (*plastid-encoded plastid RNA polymerase*, siehe Abb. 2, Lysenko und Kuznetsov 2005, Shiina *et al.* 2005, Liere und Boerner 2007). Ähnlich der Genorganisation in Bakterien wird *rpoA* in einer Gengruppe mit verschiedenen ribosomalen Proteinen gefunden, während *rpoB*, *C1*, *C2* zusammen ein funktionelles Operon bilden (Shinozaki *et al.* 1986, Kaneko *et al.* 1996). Diese Gene weisen eine Sequenzhomologie von ~26-50% zu den Genen der Cyanobakterien auf (Igloi und Kössel 1992). Die beiden Untereinheiten β und β' können die homologen Untereinheiten der *E.coli* RNA Polymerase funktionell substituieren (Severinov *et al.* 1996). Die PEP ist außerdem gegenüber bakteriellen Inhibitoren der Transkription sensitiv, z.B. Tagetitoxin, was einen hohen Grad der Konservierung dieser eubakteriellen RNAPs im Laufe der Evolution demonstriert (Mathews und Durbin 1990, Sakai *et al.* 1998).

Darüber hinaus wird das PEP-Core-Enzym, wie auch in Cyanobakterien, erst durch die Anlagerung von σ -Faktoren zum Holoenzym ergänzt, um die spezifische Promotorerkennung zu gewährleisten (Allison 2000, Link 1996, Schweer *et al.* 2010). Die σ -Faktoren sind kernkodiert und es existieren sechs Gene für PEP σ -Faktoren in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (*SIG1* - *SIG6*, Liere *et al.* 2011 und hier enthaltenen Referenzen).

Die PEP kann als lösliches oder als unlösliches Protein aus Plastiden isoliert werden. Der nicht-lösliche Komplex ist mit der plastidären DNA und anderen Proteinen assoziiert und als sogenanntes „transkriptionsaktives Chromosom“ („*transcriptionally active chromosome*“, TAC) bekannt (Briat *et al.* 1979, Greenberg *et al.* 1984, Little und Hallick 1988, Suck *et al.* 1996). Dieser TAC-Komplex ist ein membrangebundener hochmolekularer DNA/RNA-Proteinkomplex mit ungefähr 40-60 Proteinen und imstande *in vitro* DNA zu transkribieren (Hallick *et al.* 1976, Krause und Krupinska 2000, Reiss und Link 1985, Pfalz *et al.* 2006).

Auch in Nukleoid-Aufreinigungen von Plastiden wurden, wie in den TAC-Komplexen, die Untereinheiten der PEP identifiziert (Sato *et al.* 2003, Majeran *et al.* 2012). Experimentelle Unterschiede in der Präparation von Nukleoiden und des TAC-Komplexes führten zur Identifikation von weiteren Proteinfaktoren. Der TAC repräsentiert eine reinere Präparation der RNA Polymerase. Mitunter wird der TAC auch als Kern plastidärer Nukleotide bezeichnet (Melonek *et al.* 2012, Krupinska *et al.* 2013). Im Gegensatz zu den Nukleoiden oder TACs ist die lösliche Form der PEP mit einer weitaus geringeren Zahl von Proteinen assoziiert (Steiner *et al.* 2011, Pfalz und Pfannschmidt 2013). In Tabak und Senf konnte gezeigt werden, dass 15-30 zusätzliche Proteine in hochreinen löslichen PEP Präparationen zu finden sind (Suzuki *et al.* 2004, Steiner *et al.* 2011). Erst durch exogene Zugabe von DNA konnte eine Transkriptionsaktivität dieser Fraktion induziert werden (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Obwohl die PEP Kernuntereinheiten in den membranständigen Nukleoiden und TACs detektiert wurden, bleibt weiterhin unklar, wo im Chloroplasten die PEP lokalisiert ist.

Die Identifikation der prokaryotischen Kernuntereinheiten α , β , β' und β'' sowohl in TAC-Präparationen als auch in Präparationen der löslichen PEP führte zu der Annahme, dass es sich hierbei nicht um zwei verschiedene RNA Polymerasen handelt, wie ursprünglich vermutet, sondern zwei unterschiedliche biochemische Präparationen desselben Komplexes repräsentieren (Hu und Bogorad 1990, Hu *et al.* 1991, Pfannschmidt *et al.* 2000, Suck *et al.* 1996). Die PEP unterliegt während der lichtabhängigen Reifung von Proplastiden zu den Chloroplasten strukturellen Reorganisationen. In photosynthetisch inaktiven Etioplasten besteht sie nur aus den bakteriellen Kernuntereinheiten (Pfannschmidt und Link 1997). PEP Präparationen von photosynthetisch aktiven Chloroplasten weisen hingegen eine komplexere Zusammensetzung mit mehreren zusätzlichen kernkodierten Proteinen auf (siehe

Abb. 2B, Pfannschmidt und Link 1997). Insgesamt wurden mehr als 50 Proteine identifiziert, die mit der PEP und/ oder dem TAC komplexieren (Pfannschmidt und Link 1994, Pfannschmidt *et al.* 2000, Loschelder *et al.* 2004, Suzuki *et al.* 2004, Pfalz *et al.* 2006, Schroter *et al.* 2010, Steiner *et al.* 2011). Die Anlagerung verschiedener, meist kernkodierter, akzessorischer Proteinkomponenten an das Core-Enzym verleihen der PEP weitere Eigenschaften, um schließlich den Chloroplasten in das Zellnetzwerk der Pflanze zu integrieren (Liere *et al.* 2011). In Algen ist die PEP wahrscheinlich allein für die Transkription plastidärer Gene verantwortlich (siehe Abb. 2), wohingegen sie in den meisten Landpflanzen durch eine zusätzliche RNAP Aktivität unterstützt wird (siehe Kap. 1.2.2.2, Liere *et al.* 2011).

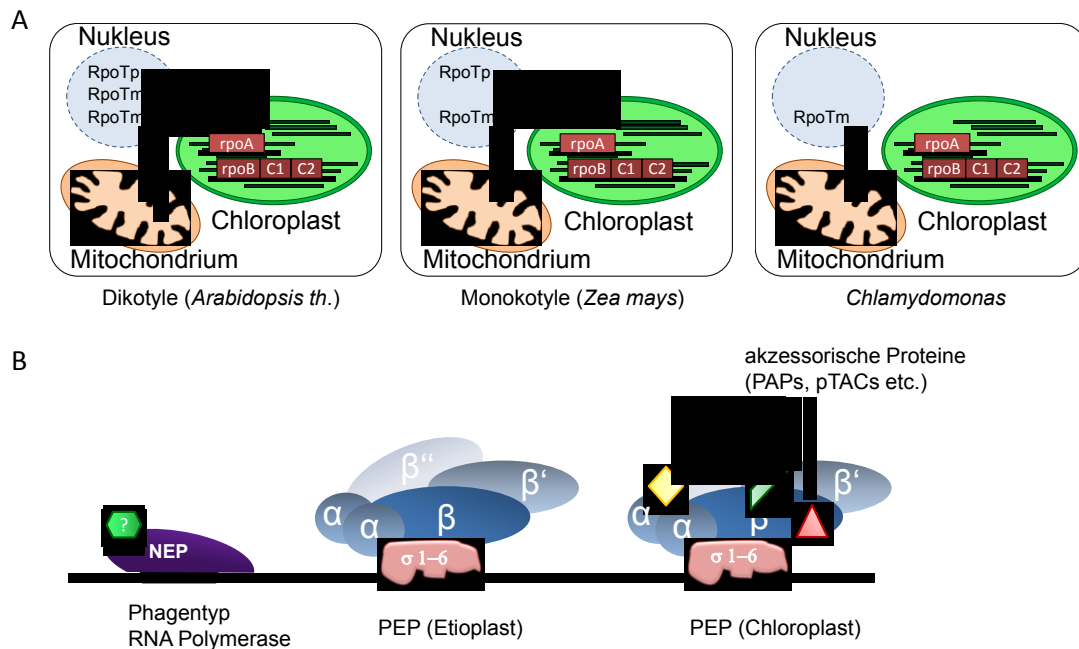


Abb. 2: RNA Polymerasen in den Organellen. (A) Gene im Kern kodieren für *RpoT* Polymerasen, die in die Chloroplasten und /oder Mitochondrien transportiert werden. Dikotyle Pflanzen wie *Arabidopsis* und *Nicotiana* besitzen drei *RpoT* Gene (*RpoTp*, *RpoTm* und *RpoTnp*, kurz als NEP bezeichnet). In Monokotylen ist die NEP nur durch eine *RpoT* Polymerase (*RpoTp*) repräsentiert. In *Chlamydomonas* existiert nur eine mitochondriale *RpoT* Polymerase (*RpoTm*). Chloroplasten besitzen zusätzlich in ihrem Genom Gene, die für eine plastidäre bakterielle RNA Polymerase kodieren (*rpoA*, *B*, *C1*, *C2*, kurz als PEP bezeichnet). Abbildung verändert nach Liere *et al.* (2011). (B) Struktur von RNAPs in Chloroplasten. Die NEP besteht nur aus einer Untereinheit. Dem gegenüber steht die multimer organisierte PEP, welche sich aus 2 x α , jeweils einer β , β' und β'' Untereinheit sowie kernkodierten σ -Faktoren (σ 1-6) zusammensetzt. Während der Entwicklung vom Etioplasten bis zum Chloroplasten ist die PEP mit einer Vielzahl von akzessorischen Proteinen assoziiert. Abbildung verändert nach Yagi und Shiina (2012).

1.2.2.2 Kernkodierte plastidäre RNA Polymerase (NEP)

Neben der PEP existiert eine zweite RNA Polymerase in Chloroplasten, die sogenannte kernkodierte plastidäre RNA Polymerase (*nuclear-encoded plastid RNA polymerase*, NEP). Den ersten Beweis, dass eine oder mehrere NEP Enzyme für die Transkription essentiell sind, lieferte die Entdeckung einer Rifampicin-sensitiven und -resistenten Form der RNA Polymerase in Mais (Bogorad 1991). Diese Beobachtung wurde zusätzlich durch den Fund eines 110 kDa großen Proteins in jungen Chloroplasten aus Spinat unterstützt, das Eigenschaften einer monomeren DNA-abhängigen RNA Polymerase aufwies (Lerbs-Mache 1993). Eine aktive RNA Synthese in ribosomdefizienten und somit auch PEP-defizienten Plastiden führte zu der Annahme, dass im Zellkern mindestens ein Gen für diese RNAP Aktivität kodiert sein muss (Han *et al.* 1993, Hess *et al.* 1993). Einen zusätzlichen Hinweis lieferte die Beobachtung einer Transkriptionsaktivität in transplastomischen PEP-defizienten Tabakpflanzen (Allison *et al.* 1996, Hajdukiewicz *et al.* 1997a, Krause *et al.* 2000, Legen *et al.* 2002). Diese Mutanten sind albinotisch, was dafür spricht, dass die NEP nicht allein für die Genexpression und damit für die Biogenese photosynthetisch aktiver Chloroplasten ausreichend ist. Nur in parasitär lebenden nicht-photosynthetischen Pflanzen wie *Epifagus virginiana* und Pflanzen der Gattung *Cuscuta*, die keine Gene der PEP-Core-Untereinheiten kodieren, stellt die NEP die wahrscheinlich einzige treibende Kraft der Transkription dar (Ems *et al.* 1995, Krause *et al.* 2003, McNeal *et al.* 2007).

Im Gegensatz zur PEP stammt die NEP nicht von Bakterien sondern von Bakteriophagen T3/7-Typ RNA Polymerasen ab. Es handelt sich um ein monomeres Enzym. In den Dikotylen wie *Arabidopsis* und *Nicotiana glauca* sind drei Gene zu finden, die Verwandtschaft zu den Phagentyp RNA Polymerasen aufweisen (*RpoTp*, *RpoTmp* und *RpoTm*, zusammengefasst in Liere *et al.* 2011, Abb. 2). Die Produkte dieser Gene werden in die Chloroplasten (*RpoTp*), in die Mitochondrien (*RpoTm*) oder in Mitochondrien und Chloroplasten (*RpoTmp*) transferiert (Abb. 2). Demnach wird die NEP Aktivität in den Chloroplasten der Dikotylen durch zwei kernkodierte Polymerasen (*RpoTp* und *RpoTmp*) ausgeführt (Chang *et al.* 1999, Azevedo *et al.* 2006). In Monokotylen wird die NEP nur durch die *RpoTp* Polymerase repräsentiert (zusammengefasst in Liere und Boerner 2007, Liere *et al.* 2011, Weihe *et al.* 2012). Die Grünalge *Chlamydomonas* besitzt nur ein einziges *RpoT* Gen, welches sehr

wahrscheinlich für eine mitochondriale und nicht für eine plastidär lokalisierte Polymerase kodiert (siehe Abb. 2). Die Inhibition der PEP führte hier zu einem generellen Verlust der plastidären Genexpression (Guertin und Bellemare 1979, Ramundo *et al.* 2013). Ramundo *et al.* (2013) konnten durch Verwendung eines Riboswitches, bei dem die Genexpression durch exogenes Vitamin B1 in *Chlamydomonas* reguliert wird, zeigen, dass *rpoA* für das photo- und heterotrophe Zellwachstum und damit für das Überleben von *C. reinhardtii* essentiell ist.

1.2.3 Plastidäre Promotoren

1.2.3.1 Struktur und Sequenz der PEP Promotoren

Viele Promotoren, welche von der PEP erkannt werden, weisen typische Konsensus-Sequenzen der bakteriellen σ^{70} -Promotoren auf (zusammengefasst in Weihe 2004, Shiina *et al.* 2005). Ungefähr 35 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle befindet sich die Sequenz TTGaca. Im Bereich -10 ist häufig die sogenannte TATA-Box mit der Konsensus-Sequenz TataaT zu finden. Die *E.coli* RNAP kann plastidäre Promotoren mit dieser Sequenz erkennen, was für den (cyano)-bakteriellen Ursprung von Chloroplasten spricht (zusammengefasst in Liere *et al.* 2011 und hier enthaltener Referenzen). Einige PEP Promotoren sind durch zusätzliche *cis*-regulatorische Sequenzen charakterisiert, wie z.B. der *psbA* Promotor in Senf, der eine zusätzliche TATA-Box zwischen der -10 und -35 Region besitzt (Link 1984, Eisermann *et al.* 1990). Die kernkodierten Sigmafaktoren verleihen der PEP die Fähigkeit, unter verschiedenen Umweltbedingungen und zu verschiedenen Zeitpunkten des Entwicklungsprozesses, an unterschiedliche Promotoren zu binden (Isono *et al.* 1997b, Allison 2000, Fujiwara *et al.* 2000, Lysenko 2007, Schweer *et al.* 2010).

1.2.3.2 Struktur und Sequenz der NEP Promotoren

Promotoren der NEP konnten in Pflanzen charakterisiert werden, denen die PEP Aktivität fehlte oder diese vermindert war (Allison *et al.* 1996, Hajdukiewicz *et al.* 1997a, Hubschmann und Börner 1998, Silhavy und Maliga 1998, Zhelyazkova *et al.* 2012). Die meisten plastidären NEP Promotoren besitzen die Konsensus-Sequenz YRTA (Typ I a), ähnlich zu den mitochondrialen Promotoren der Landpflanzen. Eine

Unterklasse der NEP Promotoren besitzt zusätzlich eine GAA-Box stromaufwärts des YRTA Motivs (Typ I b) (Kapoor und Sugiura 1999). Typ II Promotoren, wie z.B. der *clpP* Promotor, weisen keine dieser Sequenzmotive auf, besitzen aber wichtige Sequenzen stromabwärts der Transkriptionsinitiationsstelle (zusammengefasst in Weihe und Börner 1999, Liere und Maliga 2001). Zusätzliche NEP Promotoren konnten für das *rrn* Operon in Spinat, Senf und *Arabidopsis th.* (Pc Promotor) und für interne Promotoren einiger tRNAs verzeichnet werden (Liere und Börner 2007).

1.2.4 Zusammenspiel von PEP und NEP

Die oben genannten RNA Polymerasen sind für die Transkription von verschiedenen Typen der plastidären Gene verantwortlich. Basierend auf den jeweiligen Promotoren können plastidäre Gene und Operons in drei Klassen eingeordnet werden: (i) nur PEP (Klasse I), (ii) PEP und NEP (Klasse II) und (iii) nur NEP Promotoren (Klasse III) (Hajdukiewicz *et al.* 1997b). Klasse I beinhaltet hauptsächlich Photosynthesegene, die ausschließlich von σ^{70} -Promotoren transkribiert werden. Dazu zählen z.B. *rbcL*, *psbA* und *psbD* (Allison *et al.* 1996). Klasse II Transkriptionseinheiten wie *rrn*, *atpB*, *atpI* und *clpP* besitzen sowohl PEP als auch NEP Promotoren und zählen größtenteils zu den sogenannten Haushaltsgenen (*housekeeping genes*, Allison *et al.* 1996, Hajdukiewicz *et al.* 1997b). Die dritte Klasse (Klasse III) ist klein und umfasst neben den Genen *accD* und *ycf2* auch das *rpoB*-Operon. Die Promotoren dieser Gene werden hauptsächlich von der NEP bedient (Hajdukiewicz *et al.* 1997b, Hess *et al.* 1993). Die meisten chloroplastidären Gene werden sowohl durch die PEP als auch durch die NEP transkribiert, was Analysen in *Nicotiana tabacum* $\Delta rpoA$ Knockout Mutanten (Legen *et al.* 2002), der Vergleich von Transkriptionsstartpunkten in normalen und ribosomdefizienten Plastiden (Zhelyazkova *et al.* 2012), sowie die Darstellung plastidärer Transkriptome in Anwesenheit eines PEP Inhibitors (Demarsy *et al.* 2006, Demarsy *et al.* 2012) bestätigten. Dabei hat die PEP einen wesentlichen Einfluss auf die Produktion von mRNAs der Photosysteme und die NEP auf die des genetischen Apparats der Chloroplasten.

In allen bisher untersuchten Plastidentypen (Chloroplasten, Etioplasten, Amyloplasten, und Chromoplasten) konnte sowohl PEP als auch NEP Aktivität nachgewiesen werden (Marano und Carrillo 1992, Tiller und Link 1993, Isono *et al.* 1997a, Baginsky *et al.* 2004, Barsan *et al.* 2010). Während der frühen

Blattentwicklung in jungem, nicht-grünen Gewebe sind hauptsächlich NEP Promotoren aktiv, wohingegen die PEP Aktivität während der Reifung von Chloroplasten stetig ansteigt (Baumgartner *et al.* 1993, Courtois *et al.* 2007, Liere *et al.* 2011, Zoschke *et al.* 2007). Zu welchem Zeitpunkt ein Umschalten von NEP zu PEP stattfindet, konnte bisher nicht geklärt werden. Bekannt ist, dass PEP und NEP während der Entwicklung des Chloroplasten vom Samen (weiß) zum Blatt (grün) invers reguliert sind (Baumgartner *et al.* 1993, Demarsy *et al.* 2006). Das heißt, während des frühen Stadiums der Samenkeimung ist zunächst die NEP aktiv, um das PEP Transkriptionssystem und die chloroplastidäre Translationsmaschinerie aufzubauen. Anschließend transkribiert die PEP Photosynthesegene zum Aufbau und Erhalt des Photosyntheseapparats, wohingegen die NEP Aktivität während der Ergrünung zurückgeht. Dementsprechend sind hohe NEP und geringe PEP Aktivitäten charakteristisch für nicht-photosynthetische Plastiden. Dieses koordinierte Zusammenspiel beider Polymerasen ist essentiell für die Differenzierung von Plastiden (zusammengefasst in Yagi und Shiina 2012).

1.2.5 Einblick in die Transkription der Plastiden mittels ChIP-on-Chip

Die Methode der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ermöglicht die Untersuchung von Zielregionen DNA-bindender Proteine. So können *in vivo* Interaktionen der RNA Polymerase, Transkriptionsfaktoren und akzessorischer Proteine mit der DNA direkt studiert werden (Aparicio *et al.* 2004). Durch die Vernetzung von DNA-Protein-Komplexen mit Formaldehyd werden diese *in vivo* konserviert. Anschließend erfolgt die Immunopräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein. Die kopräzipitierten DNA Liganden können mittels sogenannter *Microarrays* frei von systematischen Fehlern auf genomweiter Ebene analysiert werden (ChIP gekoppelt mit einer *Microarray* Analyse, ChIP-on-Chip Analysen, siehe Abb. 3). Diese Technik führte bereits erfolgreich zur Aufklärung der Lokalisation DNA-bindender Proteine (Ren *et al.* 2000), der Beziehung zwischen Transkriptionsaktivität und eukaryotischer Chromatinstruktur (Sims *et al.* 2004, Wu *et al.* 2006, Guenther *et al.* 2007) und auch der Aktivität verschiedener RNA Polymerasen in Bakterien, Hefe und sogar in Menschen (zusammengefasst in Wade *et al.* 2007). Die globale Analyse der Verteilung von RNA Polymerase Pol II konnte einen ersten Einblick in den Regulationsmechanismus der Transkription geben (Gilchrist *et al.* 2009). Für die

Kartierung von Prä-Initiationskomplexen über das gesamte menschliche Genom wurden ChIP-on-Chip Analysen mit Pol II und dem Transkriptionsfaktor TFIID durchgeführt (Kim *et al.* 2005). Dabei zeigte sich, dass 13% der Gene mit Prä-Initiationskomplex-gebundenen Promotoren keine detektierbaren Transkripte erzeugten (Kim *et al.* 2005). Zudem konnte gezeigt werden, dass die RNA Polymerase Pol II hauptsächlich mit den Promotoren proteinkodierender Gene interagiert (Guenther *et al.* 2007). Dies führte zu der Annahme, dass die Mehrheit der Gene durch Pol II initiiert werden, aber nur ein kleiner Teil dieser Gene tatsächlich transkribiert wird (Guenther *et al.* 2007). Diese Korrelation zwischen Transkriptionsinitiation und der Produktion reifer Transkripte lässt sich durch eine pausierende oder stoppende RNA Polymerase erklären (Gilchrist *et al.* 2009). Dieses Phänomen wird als Promotor-proximales „*stalling*“ (blockieren) bezeichnet. Dabei wird die RNA Polymerase an die Promotoren rekrutiert, die Transkription wird initiiert, aber während der Elongation der proximalen Promotorregion verlangsamt bzw. stoppt die Polymerase (Core und Lis 2008). Das Pausieren der Pol II wurde in verschiedenen Spezies beobachtet und deutet eine besondere Form der Transkriptionsregulation als Reaktion auf verschiedene Umwelteinflüsse oder Entwicklungsprozesse an (zusammengefasst in Gilchrist *et al.* 2009).

Obwohl die kleine Genomgröße der Chloroplasten die *Microarray* Analysen erleichtern würde, beschränkt sich die Anwendung der ChIP-on-Chip Technik bislang auf eine veröffentlichte Arbeit (Prikryl *et al.* 2008). Es konnte gezeigt werden, dass WHY1, ein Mitglied der Whirly Proteinfamilie, unspezifisch über das gesamte Chloroplastengenom von Mais gebunden ist, aber die Funktion dieser Interaktion bleibt ungeklärt (Prikryl *et al.* 2008).

Andere Publikationen konzentrierten sich auf ChIP Analysen DNA-bindender Proteine, untersuchten dabei aber nur einige wenige ausgewählte Zielgene. Hanaoka und Kollegen (2012) zeigten z.B. erfolgreich das Bindungsmuster für den Sigmafaktor SIG1 in *Arabidopsis*. ChIP-qPCR Analysen detektierten eine Anreicherung von spezifischen Promotoren wie *rbcL*, *psbBT*, *clpP*, *psbEFLJ* und *psaAB*. Dies führte zu der Annahme, dass die Transkription an diesen Promotoren durch SIG1 reguliert werden kann (Hanaoka *et al.* 2012). Diese spezifische Bindung wurde unter Starklicht-Stress reduziert (Hanaoka *et al.* 2012). Ein weiterer Sigmafaktor (SIG5) bindet die Promotoren *psaAB*, *psbA* und *psbBT* (Noordally *et al.* 2013). ChIP-Untersuchungen der Kernuntereinheiten der PEP RpoA und RpoB sowie

der peripheren Untereinheiten pTAC3 und pTAC5 demonstrierten eine Assoziation mit einigen ausgewählten DNA Regionen des Chloroplasten (Yagi *et al.* 2012, Zhong *et al.* 2013). Die typischen PEP-abhängigen Gene wie *psbA*, *rbcL* und *psaA* waren mit den Untereinheiten assoziiert. Außerdem zeigten Yagi *et al.* (2012) eine lichtabhängige Assoziation der PEP Untereinheiten mit diesen DNA Sequenzen. Diese bisherigen Studien umfassen sechs PEP Promotoren (*PpsbA*, *PrbcL*, *PpsaA*, *Prn16*, *psbDLRP*, *PtrnEY*), zwei NEP abhängige Gene (*rpoA*, *rpoB*) und eine nichtkodierende, intergenische Sequenz zwischen *rps12* und *rps16* (Yagi *et al.* 2012, Zhong *et al.* 2013). Umfangreiche Analysen über die Assoziation der RNA Polymerase, Transkriptionsfaktoren oder akzessorischer Proteine über das gesamte Chloroplastengenom fehlen bislang und sind daher Teil dieser Arbeit.

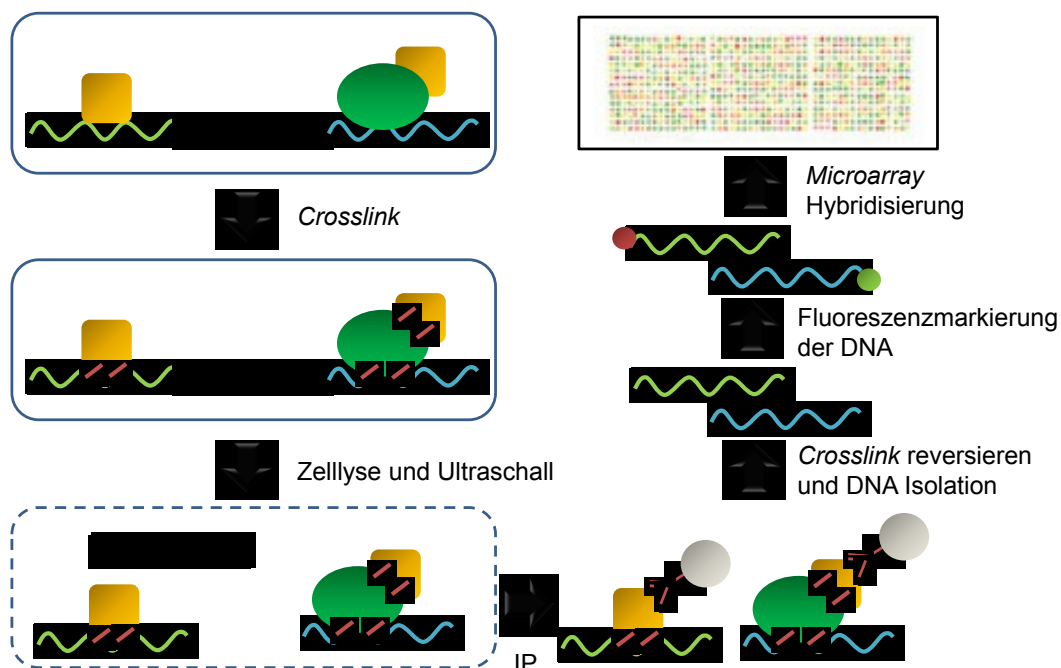


Abb. 3: Schema ChIP-on-Chip. Zellen, Chloroplasten etc. werden mit Formaldehyd behandelt und Proteine werden dabei mit DNA und/ oder Proteinen vernetzt (*Crosslink*). Anschließend werden die Zellen aufgeschlossen (Zellyse) und mit Ultraschall zur Fragmentierung der DNA behandelt. Das zu untersuchende Protein kann mit spezifischen Antikörpern präzipitiert werden (IP). Es erfolgt eine Anreicherung der DNA, die mit dem Protein direkt oder indirekt vernetzt wurde. *Crosslinks* werden mittels Hitze reversiert, DNA kann isoliert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Abschließend erfolgt die Hybridisierung der DNA auf einem *Microarray*. Abbildung verändert nach Wade *et al.* (2007).

1.2.6 Regulation der plastidären Transkription

1.2.6.1 Veränderung der Transkriptionsaktivität plastidärer Gene

Exogene und endogene Faktoren wie Licht, Temperatur, Hormone, Plastidentypen und die chloroplastidäre Entwicklung beeinflussen die Transkriptionsaktivität (Rapp *et al.* 1992, Mullet 1993, Liere und Börner 2007). Die Transkriptionsantwort auf verschiedene Entwicklungs- und Umweltveränderungen wird meist durch die Interaktion von den *Core*-Untereinheiten der RNAP mit spezifischen Sigmafaktoren und/ oder anderen regulatorischen Faktoren vermittelt. *In silico* Analysen enthüllten bis zu 78 putative chloroplastidäre Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* (Schwacke *et al.* 2007, Wagner und Pfannschmidt 2006).

Licht spielt eine große Rolle bei der Aktivierung der Transkription in Plastiden und damit auch in der Assemblierung der einzelnen PEP Komponenten (Steiner *et al.* 2011). Um schnellstmöglich den Photosyntheseapparat aufzubauen, geht die lichtinduzierte Entwicklung von Plastiden mit einem Anstieg der Transkription plastidärer Gene einher. Diese lichtabhängige Transkription tritt sowohl bei der Ergrünung von Blättern als auch in reifen Chloroplasten auf (Überblick in Liere *et al.* 2011). Beispiele für lichtinduzierte plastidäre Gene sind *psbA*, *psbD-psbC*, *petG*, *rbcl* und *atpB* (Klein *et al.* 1988, Haley und Bogorad 1990, Klein und Mullet 1990, Sexton *et al.* 1990, Isono *et al.* 1997a). In Algen und höheren Pflanzen haben auch der zirkadiane sowie der Tagesrhythmus einen Einfluss auf die Expression einiger plastidärer Gene meist vermittelt durch z.B. Sigmafaktoren (Piechulla und Gruissem 1987, Nakahira *et al.* 1998, Kanamaru *et al.* 1999, Morikawa *et al.* 1999, Noordally *et al.* 2013). Der Redoxzustand des Plastoquinon Pools (PQ) in *Sinapis alba* und *Pisum sativum* zeigte ebenso einen Effekt auf die plastidäre Transkription (Pfannschmidt *et al.* 1999a, Pfannschmidt *et al.* 1999b, Tullberg *et al.* 2000). Erfolgt die Reduktion des PQ Pools, so ist die Transkription von *psaAB* (kodieren für Untereinheiten des PSI) verstärkt, wohingegen eine verstärkte Transkription von *psbA* (kodiert für das D1 Protein des PSII) auftritt, wenn der PQ Pool oxidiert vorliegt (Steiner *et al.* 2009). Es ist anzunehmen, dass die Kontrolle der plastidären Transkription über mehrere verschiedene Redoxsignalwege vermittelt wird, welche von wechselnden Umweltbedingungen abhängig sind (Link 2003, Pfannschmidt und Liere 2005, Liere *et al.* 2011).

1.2.6.2 Dynamik des PEP Komplexes

Bei der Entwicklung von Etioplasten zu Chloroplasten verändert sich die Struktur der PEP drastisch. Sie wandelt sich von der einfachen bakteriellen *Core*-Struktur bis hin zu einer komplexen RNA Polymerase, die mit vielen verschiedenen Proteinen assoziiert ist (siehe Abb. 2 B, Hu und Bogorad 1990, Hu *et al.* 1991, Pfannschmidt und Link 1994, Pfannschmidt *et al.* 2000). Die Rekrutierung von weiteren Untereinheiten mit zusätzlichen enzymatischen Aktivitäten wurde als evolutionäre Adaption der PEP an verschiedene Bedingungen im Chloroplasten interpretiert (Link 1996, Pfannschmidt und Liere 2005). Diese zusätzlichen Proteine haben möglicherweise regulatorische Funktionen in der plastidären Transkription. Wird eines dieser PEP-assoziierten Proteine (PAPs) inaktiviert, führt dies meist zu den gleichen makroskopischen und molekularen Defekten, wie sie bei Δrpo Mutanten auftreten (z.B. albino Phänotyp, Reduktion PEP-abhängiger Transkripte, während die Abundanz NEP-abhängiger Transkripte nahezu unverändert bleibt, Allison *et al.* 1996, De Santis-Maciossek *et al.* 1999, Hajdukiewicz *et al.* 1997b, Steiner *et al.* 2011). Da die PAPs eine Vielzahl von verschiedenen Funktionen ausüben (Steiner *et al.* 2011), ist es unwahrscheinlich, dass der Verlust eines jeden einzelnen PAPs zum gleichen Funktionsverlust führt (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Demnach wird angenommen, dass das Fehlen eines der PAPs die Formation des PEP Komplexes während der plastidären Entwicklung stört und schließlich zum PEP Verlust führt (Pfalz und Pfannschmidt 2013). PAP Proteine sind genauso wie die *rpo* Untereinheiten für eine funktionsfähige PEP essentiell (zusammengefasst in Pfalz und Pfannschmidt 2013). Zu den bekanntesten PEP-assoziierten Proteinen zählen die sogenannten „*plastid transcriptionally active chromosome*“ (pTAC) Proteine. Proteomische Analysen identifizierten 18 pTAC Proteine, die nicht in Bakterien konserviert sind (Pfalz *et al.* 2006). Ihre primäre Funktion bleibt ungeklärt (Pfalz *et al.* 2006, Pfalz und Pfannschmidt 2013). Für pTAC3 und pTAC5 konnte eine direkte Bindung an den PEP Komplex nachgewiesen werden (Yagi *et al.* 2012, Zhong *et al.* 2013). Um die Regulation der Transkription und auch die PEP Komplexbildung zu verstehen, ist es unbedingt notwendig alle Faktoren des dynamischen Proteinkomplexes zu identifizieren und auch deren potentielle Funktion zu bestimmen.

1.3 Posttranskriptionelle Prozesse

Eine entscheidende Funktion bei der Regulation der plastidären Genexpression übernehmen posttranskriptionelle Prozesse. Da die Transkriptionsprodukte von beiden Polymerase-Typen meist polycistronisch vorliegen, werden die primären Transkripte einer Reihe von Prozessierungen durch endonukleolytische Schnitte und durch Reifung der 5'- und 3'-Enden unterzogen. Zusätzlich werden viele Vorläufertranskripte ediert und gespleißt. Auch die Transkriptstabilität und Degradation der synthetisierten RNAs ist von großer Bedeutung. Die meisten Faktoren dieser Prozesse sind vornehmlich im Kerngenom kodiert (Barkan und Goldschmidt-Clermont 2000, Stern *et al.* 2010). Die größte Familie kernkodierter Prozessierungsfaktoren stellt dabei die RNA-bindende PPR (*pentatricopeptide repeat*)-Proteinfamilie dar (z.B. in Schmitz-Linneweber und Small 2008, Shikanai und Fujii 2013).

1.3.1 Prozessierung, Stabilität und Degradation

Das Prozessieren polycistronischer Primärtranskripte in monocistronische RNAs, die Reifung der Transkriptenden im 5'- und 3'-Bereich, sowie die Degradation bzw. Stabilität der Transkripte ist von kernkodierten Endo- und Exonukleasen sowie von spezifischen PPR-Proteinen abhängig (Übersicht in Bollenbach *et al.* 2007).

Anfangs wurde vermutet, dass die intercistronische, nukleolytische Spaltung durch spezifische Endonukleasen, die prozessierte 5'- und 3'-Enden mit benachbarten Nukleotiden generieren, vermittelt wird (Bollenbach *et al.* 2007). Jedoch konnte gezeigt werden, dass das prozessierte 5'-Ende des *petD* Transkripts mit dem stromaufwärts gelegenen 3'-Ende des *petB* Gens um etwa 30 nt überlappt und demnach nicht mit einem einzigen nukleolytischen Schnitt zu erklären ist (Barkan *et al.* 1994). Basierend auf Analysen von *ppr10* Mutanten in Mais konnte erst kürzlich ein Model für die Prozessierung polycistronischer Transkripte erstellt werden. Demnach erfolgt die Spaltung zufällig in dem Vorläufermolekül und PPR10 bindet an die intergenische Region von *atpl-atpH* und *psaJ-rpl33* (Pfalz *et al.* 2009). Dabei bildet es eine Blockade für 5' → 3' und 3' → 5' Exonukleasen, sodass die korrespondierenden prozessierten 5'- und 3'-Enden definiert werden (Pfalz *et al.* 2009). Die 5'-Enden können aber auch durch die Transkription als sogenannte

primäre 5'-Enden entstehen (Bollenbach *et al.* 2007). Die 3'-Enden von Transkripten in Chloroplasten entstehen eher selten durch Transkriptionstermination (Stern *et al.* 2010). Einige Transkripte weisen in ihrem 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) sogenannte Stammschleifen Strukturen auf (Gruissem *et al.* 1988, Stern und Gruissem 1987). Diese Sekundärstrukturen, aber auch protektierende RNA-bindende Proteine stellen ein Hindernis für 3' → 5' Exonukleasen (z.B. Polynukleotid Phosphorylase, PNPase) dar und generieren so das reife Transkriptende (Prikryl *et al.* 2011, Yehudai-Resheff *et al.* 2001). Eine weitere 3' → 5' Exonuklease, die Ribonuklease R (RNR1), ist bei der Degradation sowie dem Trimmen plastidärer Transkripte involviert (Germain *et al.* 2012). Erst kürzlich wurde eine 5' → 3' Exonuklease in Chloroplasten identifiziert (RNaseJ, Luro *et al.* 2013). Diese zeigte sowohl eine Endonuklease- als auch 5' → 3' Exonukleaseaktivität und lokalisiert in *Arabidopsis* Chloroplasten (Luro *et al.* 2013)

Die Stabilität chloroplastidärer mRNAs kann stark variieren und ist abhängig von Licht und Blattentwicklung (Baumgartner *et al.* 1993, Kim *et al.* 1993, Klaff und Gruissem 1991). Zusätzlich wird sie durch RNA-bindende Proteine beeinflusst zu denen neben den PPRs auch die chloroplastidären Ribonukleoproteine (cpRNPs) zählen (Kupsch *et al.* 2012). Die RNA Degradation erfolgt in drei Schritten: (i) endonukleolytische Schnitte, (ii) Polyadenylierung und (iii) exonukleolytischer Abbau (Übersicht in Barkan 2011, Stern *et al.* 2010).

1.3.2 Spleißen

Die Plastome höherer Pflanzen besitzen zwei verschiedene Introntypen, Gruppe I und Gruppe II Introns, die sich hauptsächlich im Spleißmechanismus und in ihren konservierten strukturellen Elementen unterscheiden (Fedorova *et al.* 2007, Haugen *et al.* 2005). In den Chloroplasten der Landpflanzen existiert nur ein Gruppe I Intron (*trnL*). Dem stehen 20 Gruppe II Introns in *Arabidopsis* und Tabak, sowie 17 Gruppe II Introns in Mais gegenüber (Schmitz-Linneweber und Barkan 2007, Stern *et al.* 2010). Alle chloroplastidären Introns stammen von selbstspleißenden (*self-splicing*) Ribozymen ab, allerdings konnte *in vivo* das Selbstspleißen nicht nachgewiesen werden (Übersicht in Schmitz-Linneweber und Barkan 2007). Demnach ist das effektive Spleißen der Introns von kernkodierten Proteinfaktoren abhängig (Barkan 2011). Dazu kommt ein plastidär kodierter Faktor, die Maturase K, der für das

Spleißen einiger Gruppe II Introns benötigt wird (Zoschke *et al.* 2010). Einige Vertreter besitzen RNA-bindende Domänen, die sogenannten CRM (*chloroplast RNA splicing and ribosome maturation*)-Domänen, wie z.B. CAF1/2, CFM2/3, CRS1. Vertreter der PPR-Proteine sind auch beim Spleißen beteiligt. PPR4 besitzt neben den PPR-Motiven eine RRM (*RNA recognition motif*)-Domäne (Schmitz-Linneweber *et al.* 2006). Weitere Spleißfaktoren sind OTP51 mit einer LAGLIDADG-Domäne (de Longevialle *et al.* 2008) und WTF1 mit seiner PORR-Domäne (Kröger *et al.* 2009). CRS2 zeigt Ähnlichkeiten zur Peptidyl-tRNA-Hydrolase und ist essentiell für das Spleißen einiger Gruppe II Introns, RNC1 mit einer RNase III Domäne konnte in Komplexen mit Gruppe II Introns gefunden werden (zusammengefasst in Stern *et al.* 2010). Jedes Intron bindet eine Kombination aus vielen Faktoren und assembliert mit diesen zu sogenannten Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs, Schmitz-Linneweber und Barkan 2007). Ob dieser Prozess möglicherweise kotranskriptionell stattfindet und eine regulatorische Rolle während der Entwicklung von Chloroplasten und bei der Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen spielt, wurde bisher kaum untersucht (Schmitz-Linneweber und Barkan 2007).

1.3.3 Edierung

Eine weitere charakteristische Eigenschaft der Genexpression in Chloroplasten der Landpflanzen ist die Modifizierung von mRNA Sequenzen durch RNA Edierung. Dieser Prozess wurde in verschiedenen Organismen diverser Taxa beschrieben (Gott und Emeson 2000, Knoop 2011). In pflanzlichen Organellen ist die RNA Edierung meist durch Cytosin (C) zu Uridin (U) Deaminierung, seltener von U nach C gekennzeichnet. Die tRNAs besitzen zusätzlich eine Adenin nach Inosin Umwandlung (Überblick in Finster *et al.* 2012).

Typische Gefäßpflanzen besitzen 30-40 Edierungsstellen in Chloroplasten, wohingegen das Hornblattgewächs *Anthoceros formosae* 942 (Kugita *et al.* 2003) und der Farn *Adiantum capillus-veneris* 350 Stellen aufweisen (Wolf *et al.* 2004). Edierungsstellen sind nicht zufällig über das Genom verteilt, sondern meist in kodierenden Bereichen zu finden, wo sie zur Restauration von konservierten Codons führen und damit essentiell für die Proteinfunktion sind (Bock *et al.* 1994, Schmitz-Linneweber *et al.* 2005a). Außerdem können Edierungsereignisse zur Generierung/

Entfernung von Start- bzw. Stoppcodons führen (z.B. in Hoch *et al.* 1991, Wintz und Hanson 1991).

Für die Edierung sind sowohl *cis*-Elemente als auch Transfaktoren erforderlich. Dabei scheint die -1 Position kritisch zu sein (Hirose *et al.* 1999, Bock *et al.* 1996). Außerdem gibt es Sequenzähnlichkeiten zwischen den Edierungsstellen ca. 15 bp stromaufwärts der Edierungsstelle, (Chateigner-Boutin und Hanson 2002, Chateigner-Boutin und Hanson 2003, Tillich *et al.* 2006). Bisher konnte aber keine Konsensus-Sequenz identifiziert werden. Transfaktoren sind kernkodiert und werden von verschiedenen PPR-Proteinen repräsentiert (Übersicht in Hammani *et al.* 2009). Viele der PPRs, von denen eine Beteiligung bei der Edierung bekannt ist, weisen an ihrem C-Terminus eine E (*extended*)-Domäne auf (E-Subklasse) und können zusätzlich eine weitere Domäne enthalten, die DYW-Domäne (E-DYW-Subklasse, Lurin *et al.* 2004). Ein Verlust dieser PPR-Proteine führt meist zur Reduktion der Edierungseffizienz (z.B. in Kotera *et al.* 2005, Okuda *et al.* 2007, Okuda *et al.* 2006, Chateigner-Boutin *et al.* 2008, Zhou *et al.* 2009), weshalb für die E- und DYW-Motive Funktionen bei der Edierung impliziert wurden (Okuda *et al.* 2007, Okuda *et al.* 2009). Möglicherweise begünstigen die E- bzw. E-DYW-Domänen der PPRs Protein-Protein Interaktionen, die ein Edierungsenzym rekrutieren und/ oder selbst eine enzymatische Aktivität besitzen (Salone *et al.* 2007, Hammani *et al.* 2009).

Mitglieder der abundanten Proteinfamilie der chloroplastidären Ribonukleoproteine (cpRNPs) spielen wie PPR-Proteine *in vitro* (Hirose und Sugiura 2001) und *in vivo* (Tillich *et al.* 2009) für die Prozessierung einiger Edierungsstellen eine Rolle. Die cpRNPs binden viele RNAs, sodass hier wahrscheinlich ein anderer Mechanismus der Edierung als für die hochspezifischen PPRs existiert.

Eine Reihe von Forschern spekulieren, dass spezifische Edierungsereignisse eine regulatorische Rolle spielen (zusammengefasst in Finster *et al.* 2012). So könnte z.B. der Edierungsstatus der *rpoA* und *rpoB* mRNAs einen Einfluss auf die Aktivität der plastidär kodierten RNA Polymerase ausüben (Hirose *et al.* 1999, Zhou *et al.* 2009).

1.4 Translation

Chloroplasten besitzen wie Bakterien 70S Ribosomen und mRNAs die keine 5'-Cap-Struktur oder eukaryotische 3'-Poly(A) Enden aufweisen (Yamaguchi *et al.* 2000, Zerges 2000). Viele der Komponenten der Translation werden im Plastom kodiert, z.B. rRNAs, tRNAs und einige ribosomale Proteine, weitere ribosomale Proteine sind kernkodiert. Die meisten Initiationsfaktoren und Elongationsfaktoren sind ebenfalls im Kern kodiert (Sugiura *et al.* 1998a). Die kleine und große Untereinheit der Ribosomen enthalten außerdem spezifische chloroplastidäre ribosomale Proteine (PSRP 1-6), zu denen keine Homologen in Bakterien existieren (Beligni *et al.* 2004, Yamaguchi und Subramanian 2003).

Die Bindung der Ribosomen an die mRNAs in Prokaryoten erfolgt über die Basenpaarung des 3'-Endes der 16S rRNA mit der Shine-Dalgarno (SD) Sequenz in der 5'UTR der mRNA. Die SD Sequenz befindet sich meist 4-12 bp stromaufwärts des Startcodons und bringt die Ribosomen in die korrekte Position für die Translationsinitiation z.B. in (Marin-Navarro *et al.* 2007). Wie aber die Ribosomen korrekt an das Startcodon der plastidären mRNAs positioniert werden, ist bis heute ungeklärt. SD-ähnliche Sequenzen wurden in der 5'UTR von plastidären Transkripten beschrieben, allerdings unterscheiden sie sich in Position und Sequenz (Sugiura *et al.* 1998b). Die Translation einiger Transkripte (*rbcL*, *atpE* und *rps14* in Tabak, *psbA* in *Chlamydomonas*) ist abhängig von diesen SD-ähnlichen Sequenzen, einige sind nur teilweise abhängig (*rps12* und *petB* in Tabak) und andere sind unabhängig (*psbA* und *atpB* in Tabak, *petD*, *atpB*, *atpE*, *rps4* und *rps7* in *Chlamydomonas*, Mayfield *et al.* 1994, Hirose und Sugiura 1996, Fargo *et al.* 1998, Hirose und Sugiura 2004a, Hirose und Sugiura 2004b). Die Identifikation der SD-ähnlichen Sequenzen gestaltet sich sehr schwierig, da ihre Lokalisation stark variieren kann. Hinzu kommt, dass die Sequenzen der mRNAs, die für die rRNA Bindung verantwortlich sind, möglicherweise an einer ganz anderen Stelle in der 16S rRNA paaren. Dementsprechend unterscheiden sie sich von der typischen SD Sequenz (GGAGG Marin-Navarro *et al.* 2007). RNAs ohne SD-ähnliche Sequenzen sind im Bereich der Translationsinitiationsstelle wenig strukturiert und weisen keine RNA Auffaltungen am Startcodon auf (Scharff *et al.* 2011). Die Abwesenheit solcher Sekundärstrukturen ist ausreichend um die Translation von Transkripten ohne Shine-Dalgarno Sequenz zu initiieren (Scharff *et al.* 2011).

Neben den *cis*-Elementen sind zusätzliche *trans*-Faktoren an der Translation beteiligt. Diese sind kernkodiert und meist spezifisch für ein einziges Transkript. Eine Funktion bei der Translationsinitiation wurde bereits mehreren PPR-Proteinen zugesprochen, darunter PPR10, HCF152, CRP1 und PPR38 (Barkan 2011, Hattori *et al.* 2007, Pfalz *et al.* 2009, Prikryl *et al.* 2011, Schmitz-Linneweber *et al.* 2005b).

Die lichtabhängige Regulation der Translation ist bisher am besten für das *psbA* Transkript in *Chlamydomonas* untersucht. Eine Stammschleifen-Struktur in der 5'UTR wird durch eine Vielzahl von Proteinen nach Belichtung gebunden und induziert die Translation (Mayfield *et al.* 1994). Neben der Regulation durch Licht kann die Translation auch an den Assemblierungsstatus von Proteinen in den Photosynthesekomplexen angepasst sein (Überblick in Marin-Navarro *et al.* 2007).

1.5 Kopplung der Transkription mit den posttranskriptionellen Prozessen

Die bakterielle Transkription und Translation sind miteinander gekoppelt. Das heißt, dass Ribosomen bereits die Translation an der naszierenden RNA initiieren, während diese noch durch die RNA Polymerase synthetisiert wird (Burmann *et al.* 2010, Epshtein *et al.* 2010, Gowrishankar und Harinarayanan 2004, Proshkin *et al.* 2010). Bisher existieren nur sehr wenige Daten dazu, ob eine ähnliche Kopplung auch in Chloroplasten stattfindet oder ob es hier zu einer räumlichen Trennung zwischen der Transkription und den stromabwärts gelegenen Ereignissen kommt, wie es im Zellkern und Zytoplasma der Eukaryoten der Fall ist. Die lange Halbwertszeit chloroplastidärer RNAs (Stern *et al.* 2010) und die Tatsache, dass mRNAs in funktionelle Proteine translatiert werden können, nachdem die Prozessierung von polycistronischen in monocistronische Transkripte erfolgt ist, bedeutet dass die Translation möglicherweise nicht obligatorisch mit der Transkription gekoppelt sein muss (Barkan 2011). So können Proteine einer komplexen Transkriptionseinheit, wie des *psbB* Genclusters, von polycistronischen und auch monocistronischen RNA Spezies translatiert werden (Barkan 1988). Dabei ist die intercistronische Prozessierung nicht zwingend notwendig für die Translation, allerdings kann sie die Translationseffizienz verstärken (Barkan 1988).

Wie bereits erwähnt, befindet sich die plastidäre DNA zusammen mit vielen assoziierten Proteinen sowie der PEP in den Nukleoiden (siehe Kap.1.1.2 und

Kap.1.2.2.1). Proteomische Analysen von Nukleoiden und TAC-Komplexen identifizierten Proteine, die in der DNA Replikation, DNA Organisation sowie in der Transkription, der mRNA Prozessierung, beim Spleißen und der Edierung involviert sind. Außerdem wurden 70S Ribosomen und Assemblierungsfaktoren der Ribosomen identifiziert (Majeran *et al.* 2012). Diese Erkenntnis könnte bedeuten, dass RNA-bindende Proteine (z.B. PPRs) und auch Ribosomen kotranskriptionell mit der naszierenden RNA interagieren. Neben den Kernuntereinheiten der PEP wurden weitere Proteine des RNA Metabolismus identifiziert, z.B. Proteine die für Prozessierung und Stabilität der RNA (HCF152, PPR10, CRP1 etc.), für die RNA Degradation (PNPase, RNaseJ, etc.), das RNA Spleißen (PPR5, RNC1, WTF1, APO1, CRS1. etc.) und RNA Edierung (CRR22, CRR28, etc.) verantwortlich sind (Majeran *et al.* 2012). Zusätzlich konnten ribosomale Proteine und Translationsfaktoren der Initiation, Elongation sowie Peptid-*release* Faktoren in Nukleoiden gefunden werden (Majeran *et al.* 2012). Diese Daten sowie die räumliche Nähe der Transkriptions- und Translationsmaschinerie lässt eine kotranskriptionelle Translation in Chloroplasten möglich erscheinen.

Möglicherweise lassen verschiedene Bindungskinetiken der einzelnen Prozesse einen Rückschluss darauf zu, welche Prozesse kotranskriptionell und welche posttranskriptionell stattfinden. Prozesse, deren RNA-Protein Interaktionen eher langsam ablaufen, erfolgen posttranskriptionell, während Prozesse, deren Interaktionen sehr schnell verlaufen, kotranskriptionell gekoppelt sind (Barkan 2011). Wie diese Kopplung aber genau aussieht, bleibt weiter offen. Analysen Nukleoid-assoziiierter RNAs sowie PEP-assoziiierter naszierender RNAs und Ribosomen-gebundener RNAs könnten dabei einen Einblick auf den Transkriptions-, Prozessierungs- und Translationsstatus der chloroplastidären RNAs geben und waren Teil dieser Arbeit.

1.6 Zielstellung

Plastidäre Gene werden von zwei verschiedenen RNA Polymerasen, einer plastidär kodierten RNA Polymerase (PEP) und einer kernkodierten RNA Polymerase (NEP), transkribiert. Bisher wurden die Zielgene dieser RNA Polymerasen genetisch bestimmt. So konnten in polymerasedefizienten Mutanten einzelne PEP- und NEP-abhängige Transkripte identifiziert werden. Allerdings müssen solche Analysen mit Vorsicht betrachtet werden, da sekundäre Effekte in den Mutanten mit der Transkription interferieren können.

Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit ist es, die Zielgene sowie naszierende Transkripte der plastidär kodierten plastidären RNA Polymerase *in vivo* und unter verschiedenen Lichtbedingungen auf plastomweiter Ebene zu identifizieren. Dies soll zeigen, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Lichtbedingungen die PEP ihre Zielgene transkribiert. Außerdem sollten DNA Regionen bestimmt werden, die zwar mit der PEP assoziiert sind, bei denen aber keine aktive Transkription in Form naszierender Transkripte nachweisbar ist. Die ChIP-on-Chip (Chromatin Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung) und RIP-Chip Technik (RNA Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung) stellen zwei dafür geeignete Methoden zur Analyse von Protein-DNA bzw. Protein-RNA Assoziation dar. Die Kombination dieser beiden Techniken mit einem transplastomischen Ansatz, bei der die α -Untereinheit der RNA Polymerase mit dem HA-Epitop markiert wird, ermöglichen die Anwendung von hochaffinen monoklonalen Antikörpern zur Analyse von PEP gebundenen Nukleinsäuren. Zusätzlich ermöglicht es zum einen Protein-Interaktionspartner innerhalb des PEP Komplexes zu untersuchen und zum anderen Aufschluss über die Verteilung der PEP im Chloroplasten zu erlangen.

Um überlappende Sets von mRNAs zu untersuchen, die mit der Transkriptions- und Translationsmaschinerie assoziiert sind, sollten zusätzlich transplastomische Pflanzen erzeugt werden, die gleichzeitig an einer weiteren PEP Untereinheit (β'') und an dem ribosomalen Protein S2 der kleinen ribosomalen Untereinheit Epitopmarkierungen tragen. Dies eröffnet auch die Möglichkeit zu bestimmen, wo und wann die PEP und die Ribosomen relativ zueinander exprimiert werden. Des Weiteren könnte die Lokalisation und Transkriptassoziation beider Komplexe einen Aufschluss über die Kopplung von Transkription und Translation in Chloroplasten ermöglichen.

Inwieweit die Transkription und die posttranskriptionellen Prozesse in Verbindung stehen, sollte außerdem anhand von Transkriptanalysen in hochaufgereinigten transkriptionsaktiven Chromosomen (TACs), welche neben den Kernuntereinheiten der PEP auch Mitglieder verschiedenster Prozessierungsfaktoren enthalten, untersucht werden.

Insgesamt soll sich mit den beschriebenen Ansätzen ein genaueres, physikalisch und nicht nur genetisch abgesichertes Bild der Einbettung der PEP in die plastidäre Genexpression aus dieser Arbeit ergeben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial

Für die Plastidentransformation wurde *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana verwendet. Transplastomische Pflanzen mit Hämagglutinin Epitop (HA) markierter alpha-Untereinheit der plastidär kodierten plastidären RNA Polymerase wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Erik Eggert erzeugt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Bakterienstamm

Rekombinante Plasmide wurden in *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) hergestellt.

2.1.3 Antikörper und Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper und Oligonukleotide befinden sich im Anhang 2 (siehe Tab. 4 und Tab. 6).

2.1.4 Chemikalien und Standardlösungen

Alle verwendeten Chemikalien, soweit im Folgenden nicht beschrieben, wurden von den Firmen Carl Roth GmbH, Sigma Aldrich, SERVA, Invitrogen oder Bio-Rad bezogen.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Standardlösungen, die nicht im Text beschrieben werden, sind hier aufgelistet.

10 x SDS Laufpuffer:	1,92 M Glycin, 250 mM Tris-Base, 1 % (w/v) SDS
10 x TBST:	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl, 1 Vol.-% Tween 20
5 x Transferpuffer:	1 M Glycin, 125 mM Tris-Base
20 x SSC:	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl
50 x TAE:	2 M Tris-Acetat, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0

2.1.5 Medien

2.1.5.1 Pflanzenmedien

- MS-Medium: 4,24 % (w/v) Murashige und Skoog Basal Medium inklusive Saccharose und Agar (Sigma) bzw. 0,44 % (w/v) Murshige und Skoog Medium (Duchefa), 0,05 % (w/v) MES, 0,5 % (w/v) Pflanzenagar (Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose; pH 5,8 mit KOH; modifiziert nach Murashige und Skoog (1962)
- MS-Medium mit Spec: MS-Medium (siehe oben) inklusive Spectinomycin-Dihydrochlorid-Pentahydrat (500 µg/ml, Duchefa)
- RMOP Medium: MS-Medium mit Spec (siehe oben) inklusive 6-Benzylaminopurin (1 mg/l) und 1-Naphthylessigsäure (0,1 mg/l) von Sigma, modifiziert nach Svab *et al.* (1990)

2.1.5.2 Bakterienmedien

- LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,0 mit NaOH; modifiziert nach Bertani (1951)
- LB-Medium mit Agar: 3,5 % (w/v) LB-Agar (Sigma)
- SOB-Medium: 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Magnesiumsulfat, pH 7,0 mit NaOH, Sterilisieren im Autoklav; nach Hanahan (1983)
- SOC-Medium: SOB-Medium (siehe oben) inklusive 20 mM Glucose und 10 mM MgCl₂ (Zugabe aus einer steril filtrierten Stammlösung); nach Hanahan (1983)

2.1.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Soweit im Folgenden nicht anders beschrieben, erfolgten Zentrifugationen mit BIOFUGE® FRESCO, Heraeus Tischzentrifugen. Eine vollständige Auflistung aller Unternehmen der verwendeten Materialien und Geräte ist im Anhang 2 (Tab. 5) zu finden.

Alle anderen Materialien werden in den folgenden Kapiteln gesondert beschrieben.

2.1.7 Sonstige Materialien

Radiochemikalien wurden von Perkin Elmer oder Hartmann Analytics, Oligonukleotide bei SIGMA oder Eurofins MWG Operon, Enzyme von Fermentas und NEB, DNA-, RNA- und Protein-Größenstandards von Fermentas bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Wildtyp und transplastomische *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana wurden auf einem Gemisch aus Erde (Einheitserde Typ T; frux) und Vermiculit (4 : 1, 3-6 mm, DVD) oder auf MS-Medium unter Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit) bei 27 °C in Pflanzenanzuchtkammern angezogen. Die Düngung der Erde erfolgte mit Osmocote Pro 5-6M von Scotts (ca. 4 g Dünger/1 l Erde). Je nach Wuchshöhe betrug die Lichtintensität ca. $200\text{-}350 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$. Die Regenerate aus der Plastidentransformation wurden auf RMOP-Medium gezüchtet. Für die Isolation von Chloroplasten und jungem Pflanzengewebe wurden die Pflanzen auf wassergesättigtem Vermiculit mit Dünger (siehe oben) und einem Polyamidnetz (Maschenweite 500 μM , Franz Eckert GmbH) für sieben Tage kultiviert.

Für Dunkelexperimente wurden Pflanzen zunächst für sechs Tage unter Standardbedingungen (siehe oben) angezogen und dann in einem lichtabgeschlossenen Schrank in der gleichen Pflanzenkammer oder in Anzuchtschränken von Percival unter gleichen Temperaturbedingungen einer 16 stündigen Dunkelperiode ausgesetzt. Die Erntezeit war immer um neun Uhr morgens.

2.2.2 Sterilisation von Tabaksamen

Zur sterilen Anzucht von Tabakpflanzen auf den in Kap. 2.1.5.1 beschriebenen Medien ist eine Oberflächensterilisation der Samen mit Sterilisationslösung erforderlich. Dabei werden Samen in dieser für 15 min inkubiert, anschließend mit 70%igem EtOH für eine min sterilisiert und abschließend dreimal mit sterilem Leitungswasser gewaschen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Samen zentrifugiert und mit reichlich Leitungswasser auf das Medium pipettiert.

Sterilisationslösung: 15 Vol.-% Chlorex Lösung (Domestos, Danklorix), 0,02 Vol.-% Tween20

2.2.3 Transformation von Plastiden

Die stabile Transformation von Plastiden in Tabak erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Svab und Maliga (1993). Die Generierung geeigneter Transformationsvektoren für die Zielregion um *rpoA* ist in Finster *et al.* (2013) und in Kap. 3.1.1 beschrieben. Der Selektionsmarker (*aadA* Kasette, kodiert für die Spectinomycinresistenz) stammt aus dem Plasmid pRZN+ (Zoschke *et al.* 2010). Das Konstrukt für die Transformation der Zielregion um *rpoC2* ist im Ergebnisteil (Kap. 3.1.11) beschrieben.

Tabakpflanzen wurden steril auf MS-Medium (siehe Kap. 2.2.2) für 30 Tage angezogen und die Blätter über Nacht (ÜN) mit der Blattunterseite nach oben auf MS-Medium ausgelegt. Mit Hilfe des *Biolistic*[®] PDS-1000/He *Particle Delivery Systems* (Bio-Rad) konnten diese mit Goldpartikeln (0,6 µM, Bio-Rad, nach Herstellerangaben mit dem Transformationsvektor beladen) beschossen werden (1100 psi, L2 = 6 cm, 10 Schuss je Konstrukt). Nach zwei Tagen wurden die Blätter auf RMOP-Platten mit der Blattunterseite nach unten transferiert und Spectinomycin-resistente Kalli für 3-4 Rekombinationsrunden regeneriert. Zum Austreiben von Wurzeln wurden die Kalli zunächst auf MS-Medium kultiviert und zur Samenproduktion auf Erde ausgesetzt. Die Anwesenheit des HA-Epitops und der *aadA*-Kasette in den Transformanten wurde mittels PCR, Southern Hybridisierung, immunologisch und durch selektive Keimung auf MS-Medium mit Spectinomycin (Kap. 2.1.5.1 und Kap. 2.2.2) verifiziert.

2.2.4 Isolation von Proteinen

Die Gesamtproteinextraktion aus trockenen Samen, Keimlingen und adulten Pflanzen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Barkan (1998). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gemörkert bzw. mit einer Schwingmühle (2 x 30 s, 30 Hz; MM 400; RETSCH®) homogenisiert und anschließend in frischem Proteinisolationspuffer (pro 200 mg Frischgewicht ca. 0,5-1 ml) aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung erfolgte über das Bio-Rad Protein Assay nach Herstellerangaben. Die photometrischen Messungen wurden mit dem Novaspec®II Spektrophotometer (Pharmacia Biotech) ausgeführt.

Proteinisolationspuffer: 10 % Saccharose, 100 mM Tris-HCl, pH 7,2, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 µM Aprotinin, 2 mM PMSF, 40 mM β-Mercaptoethanol

2.2.5 Elektrophorese und Transfer von Proteinen

2.2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen. Nach Standardmethoden wurde die Gelelektrophorese ausgeführt (Laemmli 1970, Sambrook und Russel 2001).

Proteinlösungen wurden mit 0,5 Vol. 3 x SDS -Proteinladepuffer versetzt, bei 65 °C denaturiert und zusammen mit 2,5 µl eines Mengenstandards (PageRuler™ *Prestained Protein Ladder*, *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, Fermentas) in 1 x SDS Laufpuffer aufgetrennt.

Eine erhöhte Auftrennkapazität erfolgte durch die Aufteilung in Sammelgel (5 % Polyacrylamid) und Trenngel (13 % Polyacrylamid). Die Trennung wurde mittels des Mini-Protean-III™ Systems (Bio-Rad) bei einer Spannung von 50-100 V (2-3 h) durchgeführt.

Proteine wurden mittels des SilverQuest™ Kit (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben gefärbt und eingescannt oder auf Nitrozellulosemembranen transferiert (s. Kap. 2.2.5.2).

Trenngel: 375 mM Tris, pH 8,8, 13 % (v/v) Polyacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,05 Vol.-% TEMED

Sammelgel:	130 mM Tris, pH 6,8, 5 % (v/v) Polyacrylamid, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,1 Vol.-% TEMED
1 x SDS-Laufpuffer:	10 Vol.-% 10 x SDS-Laufpuffer (s. Kap. 2.1.4)
3 x SDS -Proteinladepuffer:	7 % (w/v) SDS, 15 Vol.-% β -Mercaptoethanol, 30 Vol.-% Glycerol, 200 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,05% (w/v) Bromphenolblau

2.2.5.2 Transfer von Proteinen (Western Transfer)

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte ein Transfer auf Nitrozellulosemembranen (Hybond™-C Extra, GE Healthcare) mittels Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad) bei ca. 35 V ÜN in 1 x Transferpuffer. Zur Visualisierung der transferierten Proteine und deren Qualitätskontrolle wurden die Nylonfilter für eine Minute mit Ponceau S gefärbt, mit *Aqua bidest.* mehrmals gewaschen und anschließend gescannt. Die Filter wurden direkt für die Immunodetektion eingesetzt oder bei RT getrocknet und für längere Zeit gelagert.

1 x Transferpuffer:	20 Vol.-% 5 x Transferpuffer (s. Kap. 2.1.4), 20 Vol.-% MeOH
Ponceau S:	2% (w/v) Ponceau S (Merck), 1,8 M Trichloressigsäure, 1,18 M 5-Sulfosalicylsäure

2.2.6 Immunodetektion

Zur Illustration von spezifischen Proteinen auf Nitrozellulosemembranen wurde die Immunodetektion verwendet. Um unspezifische Signale zu vermeiden, wurden die Membranen zunächst in Blockierlösung (freie Bindestellen werden blockiert) für 30 min inkubiert. Danach wurde die Membran für eine Stunde mit dem ersten Antikörper (gelöst in 1% Trockenmilch in 1 x TBST, siehe Tab. 4 im Anhang 2) versetzt. Überschüssiger Antikörper wurde in drei Waschschritten in 1 x TBST entfernt. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für eine Stunde (s. Tab. 4, Anhang 2, nicht aber wenn HA-AK-HRP als primärer Antikörper verwendet wurde). Sekundäre Antikörper enthalten meist eine gekoppelte Peroxidase (HRP =

Meerrettichperoxidase), die zusammen mit einer Detektionslösung eine chemische Reaktion katalysiert und in einer Chemilumineszenz resultiert. Vier Waschschr tte mit 1 x TBST folgten der Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem SuperSignal[®] *West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) nach dem Protokoll des Herstellers. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Die Signale wurden entweder mit Röntgenfilmen (HyperfilmTM MP, Amersham Biosciences) oder mit *Chemidoc XRS+ Imager* und Quantity-One-Software (Bio-Rad) visualisiert bzw. quantifiziert.

1 x TBST: 10 Vol.-% 10 x TBST (Kap. 2.1.4)

Blockierlösung: 4 % (w/v) Trockenmilch (SIGMA) gelöst in 1 x TBST

2.2.7 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.7.1 Extraktion von DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Pflanzengewebe erfolgte nach dem modifiziertem Protokoll von Sambrook und Russel (2001). Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und anschließend mit 2 x CTAB (ca. 1 ml pro 300 mg Blattgewicht) homogenisiert. Das Homogenisat inkubierte für eine Stunde bei 65 °C. Zur Entfernung von überschüssigem extrazellulärem Material wurden die Proben bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 10 min bei 8000 x g. Die DNA aus der wässrigen Phase wurde mit 2/3 Volumen Isopropanol gef llt, mit 75 % EtOH gewaschen, in TE-Puffer resuspendiert und mit 0,5 mg/ml RNaseA (Fermentas) für 15 min bei RT behandelt.

2 x CTAB: 2 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris, pH 8,0, 20 mM EDTA, pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2 % (w/v) PVP40

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.7.2 Extraktion von RNA

Die Isolation von RNA aus Blattgewebe erfolgte mit Hilfe des TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

2.2.7.3 Extraktion von Nukleinsäuren aus Chloroplasten

Die Extraktion von DNA und RNA aus aufgereinigten Chloroplasten (s. Kap. 2.2.11) erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Phenol/ Chloroform / Isoamylalkohol (24:24:1, v/v) und anschließender Zentrifugation bei 21.000 x g. Die wässrige Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und zur Fällung der Nukleinsäuren mit 3 Volumen 96 % EtOH versetzt. Das Präzipitat wurde, wie in Kap 2.2.7.1 beschrieben, gewaschen und resuspendiert. Je nach Verwendung wurde die DNA mit RNaseA (0,5 mg/ml) versetzt oder die RNA für den Verdau mit DNaseI (Firma Roche) nach Angaben des Herstellers behandelt.

2.2.7.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus dem TAC

Extrakte des transkriptionsaktiven Chromosoms (TAC) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Krupinska in Kiel zur Verfügung gestellt. Die Extraktion der verschiedenen TAC-Fractionen (TACI und TACII) erfolgte in Kiel nach dem Protokoll von Melonek *et al.* (2012). Des Weiteren wurde Thylakoidmembran (preTAC), die zur Erzeugung der TAC-Extrakte diente, zur Verfügung gestellt. Nukleinsäuren aus dem TAC und preTAC wurden durch Zugabe von einem Volumen Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol (24:24:1, v/v) extrahiert. Die Fällung von DNA und RNA erfolgte wie unter Kapitel 2.2.7.1 beschrieben. Die DNA wurde mit RNaseA und die RNA mit DNaseI (siehe oben) behandelt.

2.2.7.5 Extraktion von Plasmiden

Plasmide aus *E. coli* ÜN-Kulturen wurden über die alkalische Lyse und Plasmidpräparation in kleinem Maßstab nach dem Standardprotokoll isoliert (Sambrook und Russel 2001). Es folgte eine RNaseA (Fermentas) Behandlung und die Aufreinigung von Plasmiden über QIAquick-Säulchen (QIAquick *PCR Purification Kit*, QIAGEN) zur Vorbereitung für die Sequenzierung, die von der Firma SMB ausgeführt wurde.

Nach Herstellerangaben wurden Plasmide für große Ansätze mit dem Plasmid-Midi-Kit bzw. dem Plasmid-Maxi-Kit (QIAGEN) extrahiert.

2.2.7.6 Bestimmung der Qualität und Quantität von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde mittels eines Nanodrop Spektrophotometers (ND-1000, peqLab) und die Qualität über die Gelelektrophorese (Kap. 2.2.8) bestimmt.

2.2.7.7 Aufreinigung von Nukleinsäuren

PCR-Produkte und DNA Fragmente wurden über GeneJET-Säulchen (Fermentas GeneJET PCR *Purification* Kit oder GeneJET Gel *Extraction* Kit) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.2.8 Elektrophorese und Transfer von Nukleinsäuren

2.2.8.1 DNA Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Länge, Konzentration, Qualität, zur Aufreinigung der DNA und zur Vorbereitung des Southern Transfers diente die DNA Gelelektrophorese. Je nach Größe der zu trennenden DNA Fragmente betrug die Konzentration der im Gel vorhandenen Agarose (Biozym) 1,0-2,0 % (w/v). Zur Visualisierung der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) zugesetzt und die Auftrennung erfolgte in 1 x TAE bei einer angelegten Spannung von 80-100 V in einem horizontalen Elektrophoresesystem der Firma peqLab (*PerfectBlue*-Gelsystem Mini bzw. Midi). Vor der Auftragung wurden die Proben mit 1/5 Volumen 10 x DNA Ladepuffer versetzt und parallel mit einem Größenstandard (5µg GeneRuler™ 1 kb DNA *Ladder* bzw. 100 bp Plus DNA *Ladder*, Fermentas) beladen. Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und die Dokumentation erfolgte über das GelDoc *Photoimager* System (Bio-Rad).

1 x TAE: 2 Vol.-% 50 x TAE (Kap. 2.1.4)

10 x DNA Ladepuffer: 50 Vol.-% Glycerol, 2 Vol.-% 50 x TAE, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol

2.2.8.2 Transfer von DNA (Southern Transfer)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde wie in dem Protokoll von Southern (1975) beschrieben, mit folgenden Modifikationen auf eine Nylonmembran transferiert: Zunächst wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt (250 mJ, GS-Gene Linker® UV-Kammer, Bio-Rad). Das führte zu Doppelstrangbrüchen in der DNA, um die Transfereffizienz zu erhöhen. Danach folgten zwei Inkubationszeiten (15 min) des Gels in Denaturierungslösung und anschließend 10 min in Neutralisationslösung. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond™-N+, GE Healthcare) wurde in 5 x SSC Lösung durchgeführt (Southern 1975). Zur kovalenten Bindung der transferierten DNA an die Membran wurde diese mit UV-Licht behandelt (150 mJ, GS-Gene Linker® UV-Kammer, Bio-Rad) und bei 65 °C für 5 min getrocknet. Entweder konnte die Membran direkt für die Hybridisierung verwendet werden oder sie wurde bei RT gelagert.

Denaturierungslösung: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisationslösung: 1 M Tris, pH 7,4, 1,5 M NaCl

5 x SSC: 25 Vol.-% 20 x SSC (Kap. 2.1.4)

2.2.8.3 RNA Gelelektrophorese

Die Qualität der RNA wurde in einem nicht-denaturierenden Agarose-Gel bestimmt. Hierzu wurden die Proben mit einem Formamid-haltigen Puffer (2x RNA *Loading Dye*, Fermentas) versetzt und für 10 min bei 75 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte parallel mit einem Größen- und Mengenstandard in dem peqLab Elektrophoresesystem (siehe Kap. 2.2.8.1).

Für die Auftrennung von RNA Molekülen und anschließendem Northern Transfer (Kap. 2.2.8.4) wurde 1,2 % (w/v) Agarose (*Molecular Biology Agarose*, Bio-Rad) in einem denaturierendem Gel verwendet. Gleiche Konzentrationen von RNA wurden mit 3 Volumen Denaturierungspuffer versetzt, 15 min bei 75 °C denaturiert, mit 0,1 Vol. 10x RNA Ladepuffer gemischt und in 1 x MOPS Puffer (inklusive 10 Vol.-% Formaldehydlösung, Sigma) bei angelegten 100 V für 1 h aufgetrennt. Als Größenstandard dienten 0,5 µg RiboRuler™ RNA *Ladder* (*High Range* bzw. *Low*

Range, Fermentas). Das Elektrophoresesystem stammt von der Firma bsb11 biotech.

10 x MOPS:	200 mM MOPS, 80 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH
Denaturierungspuffer:	62,5 Vol.-% deionisiertes Formamid, 25 Vol.-% Formaldehydlösung, 12,5 Vol.-% 10 x MOPS, pH 7,0
10 x RNA Ladepuffer:	50 Vol.-% Glycerol, 10 Vol.-% 10 x MOPS, 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Formaldehydlösung:	36,5-38 % (w/v) Formaldehyd (Fertiggemisch für die Molekularbiologie, Sigma)
denaturierendes Gel:	1-2 g Agarose (<i>Molecular Biology Agarose</i> , Bio-Rad) in 113 ml <i>A. bidest.</i> aufkochen, auf 65°C abkühlen und mit 15 ml 10 x MOPS, pH 7,0 und 26 ml Formaldehydlösung versetzen

2.2.8.4 Transfer von RNA (Northern Transfer)

Der Transfer von gelelektrophoretisch getrennter RNA auf eine Nylonmembran (Hybond™-N, GE Healthcare) erfolgte unter neutralen Bedingungen mit 5 x SSC Lösung als Transferpuffer nach dem Standardprotokoll Sambrook und Russel (2001). Wie in Kap. 2.2.8.2, beschrieben wurde die RNA kovalent an die Membran gebunden und gelagert. Die Färbung der Membran erfolgte mit Methylenblaulösung zur Überprüfung der Transfereffizienz und Mengenstandardisierung.

Methylenblaulösung: 0,3 M NaAc, pH 5,2, 0,03 % (w/v) Methylenblau

5 x SSC: 25 Vol.-% 20 x SSC (Kap. 2.1.4)

2.2.9 Markierung, Hybridisierung und Detektion von DNA Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA Sonden (PCR-Produkte) mit [α^{32} -P]-dCTP (Perkin Elmer bzw. Hartmann Analytics) erfolgte mit dem DecaLabel™ DNA *Labeling Kit* (Fermentas) den Herstellerangaben folgend. Nichtinkorporierte freie Radioaktivität wurde über illustra MicroSpin G25- bzw. G-50 Säulchen (GE Healthcare) von PCR-Sonden getrennt gemäß dem Herstellerprotokoll. Anschließend wurden die Sonden bei 95°C denaturiert und fanden Verwendung für Northern-Membranen als auch für Dotblot-Membranen. Die Membranen wurden für eine Stunde in Church-Puffer prähybridisiert bei 55°C. Danach erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde und die Hybridisierung über Nacht bei 55°C. Die Membranen wurden abschließend jeweils 15 Minuten bei Hybridisierungstemperatur wie folgt gewaschen: einmal 0,5xSSC/ 0,1% SDS; zweimal 0,2xSSC/ 0,1% SDS.

Die Detektion radioaktiver Sonden erfolgte mittels eines *Phosphorimager* Systems (PMI FX, Bio-Rad) und die Quantifizierung der Signale mit Quantity-One-Software (Bio-Rad).

Church-Puffer: 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 mit H₃PO₄, 7 % (w/v) SDS, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation wurde Tabak chloroplastidäre DNA (siehe Kap. 2.2.7.3) verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten entweder mit der Phusion™ *High-Fidelity* DNA Polymerase (NEB) für die Klonierungen und *Tiling-Microarray* Herstellung (Kap. 2.2.3 und Kap. 2.2.13.2) oder mit einer *Thermus aquaticus* DNA Polymerase (Taq-Polymerase) für die DNA Sonden (Kap. 2.2.9). Die Zyklenzahlen lagen zwischen 28 und 35 je nach Anwendung und die Hybridisierungstemperaturen für die jeweiligen Primer lagen zwischen 50°C und 60°C. Eine Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer ist im Anhang 2 Tab. 6 zusammengefasst.

2.2.11 Chloroplastenisolation und Extraktion der Membranfraktion

Intakte Chloroplasten wurden von sieben Tage alten Keimlingen bzw. 60 Tage alten Pflanzen aus Wildtyp bzw. mit HA-markierten transplastomischen Linien (RpoA:HA Linien) von *Nicotiana tabacum* mit folgenden Modifikationen nach Voelker und

Barkan (1995) isoliert: Nach der Homogenisierung des Gewebes wurden die Chloroplasten bei 1000 x g für 6 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden zunächst in 30 ml Resuspensionspuffer gewaschen und anschließend in 1 ml Resuspensionspuffer gelöst. Anschließend erfolgte optional ein Formaldehyd *Crosslink* wie in Newell und Gray (2010) beschrieben. Dies führte zur Vernetzung der DNA und der RNA mit assoziierten Proteinen. Dieser zusätzliche Schritt war notwendig für die Immunopräzipitation von RpoA:HA und seinen assoziierten Nukleinsäuren (Kap. 2.2.13.1). Je nach Verwendung wurde die Lyse der Chloroplasten mit 300 µl Extraktionspuffer (für Chromatin Immunopräzipitation) bzw. hypotonem Polysomenpuffer (für RNA Immunopräzipitation) pro 40 g Frischgewicht vorgenommen. Das Lysat wurde 40 x durch eine Kanüle (0,5 mm x 25 mm) gezogen, um die Chloroplasten mechanisch aufzuschließen. Für RNA Immunopräzipitationen wurden diese Gesamtchloroplastenextrakte verwendet. Für Chromatin Immunopräzipitationen wurden Membranen und Stroma durch Zentrifugation bei 21.000 x g bei 4°C voneinander getrennt. Die Membranen wurden dreimal in Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in 500 µl Extraktionspuffer resuspendiert. Der Proteingehalt von Membranen und Stroma wurde, wie in Kap. 2.2.4 beschrieben, bestimmt und die Lagerung erfolgte bei -80°C in 10 Vol.-% Glycerin.

Resuspensionspuffer: 50mM HEPES-KOH, pH 8,0, 330 mM Sorbitol

Extraktionspuffer: 2 mM DTT, 200 mM KOAc, 30 mM HEPES-KOH, pH 8,0, 10 mM MgOAc, 1x Proteinase-Inhibitor Cocktail (Firma Roche)

Polysomenpuffer: 200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 200 mM KCl, 35 mM MgCl₂, 25 mM EGTA, 1 x Proteinase-Inhibitor Cocktail (Firma Roche), Heparin 0,5 mg/ml, 0,5%NP40

2.2.12 DNaseI Behandlung von Chloroplastenmembranen

Chloroplastenmembranen wurden aus 7 Tage alten Keimlingen und 60 Tage alten Pflanzen, wie oben beschrieben, ohne den optionalen *Crosslink* isoliert und in Extraktionspuffer resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden mit 200 *units* DNaseI

(Firma Roche) oder, in Kontrollreaktionen, ohne DNaseI bei Raumtemperatur inkubiert, wie in Thelen und Ohlrogge (2002) beschrieben. Durch Zentrifugation konnten Überstand und nichtsolubilisierbare Membranen voneinander getrennt werden. Membranpellets wurden in 50 µl Extraktionspuffer resuspendiert und 1/10 Volumen jeder Fraktion wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.5.1) und Immunodetektion (Kap. 2.2.6) untersucht. DNA aus Pellet und Überstand wurde mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert (Kap. 2.2.7.3), mittels Gelelektrophorese (Kap. 2.2.8.1) und PCR (Kap. 2.2.10) zum Test des DNaseI Verdaus analysiert.

2.2.13 Immunopräzipitation und *Microarray* Analyse (ChIP-on-chip, RIP-Chip)

2.2.13.1 Immunopräzipitation

In dieser Arbeit wurden zwei Arten der Immunopräzipitation (IP) angewendet: Die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) und die RNA Immunopräzipitation (RIP). Für jede IP wurden 50 µl Aliquots der resuspendierten chloroplastidären Membran (für ChIP) oder Gesamtchloroplastenextrakte (für RIP, siehe Kap. 2.2.11) mit 100 µl Extraktionspuffer bzw. Polysomenpuffer verdünnt. Das Detergenz NP-40 bewirkte das Herauslösen von membrangebundenen Proteinen. Die Proben wurden mit 1 Vol.-% NP-40 für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung der solubilisierten Membranen oder Gesamtchloroplastenextrakte mit vier kurzen Stößen von 2 s mit dem Bandelin Sonopuls HD60 Ultraschallgerät (Bandelin). Die Suspension wurde nach jedem Impuls auf Eis abgekühlt. Um feste, nicht lösliche Membranbestandteile von löslichen Proteinen zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation bei 21.000 x g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde für die anschließende IP verwendet wie in Kupsch *et al.* (2012) beschrieben. Die Präzipitation erfolgte mit 10 µl des HA-AK (Tab. 4, Anhang 2). Kontrollreaktionen enthielten WT Chloroplastenmembranen bzw. Gesamtchloroplasten. Der Komplex aus Antikörper-Protein-Nukleinsäure wurde mittels magnetischer Kügelchen (Dynabeads® ProteinG, life technologies™) über einen Magnet präzipitiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Pellet dreimal in Co-IP Puffer gewaschen und resuspendiert. Teile beider Fraktionen wurden direkt mit einer Proteingelelektrophorese und Western Transfer (Kap 2.2.5.1 und 2.2.5.2) analysiert.

Co-IP Puffer: 0,15 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM MgCl₂, 0,5 Vol.-% NP-40, 5 µg/ml Aprotinin

2.2.13.2 Herstellung eines Plastom überspannenden *Microarrays* (*Tiling-Array*)

Überlappende DNA Fragmente, die das gesamte Tabak Chloroplastengenom bis auf wenige Lücken abdecken, wurden mittels der Phusion™ *High-Fidelity* DNA Polymerase (NEB) amplifiziert wie unter Kap. 2.2.10 beschrieben. Von jedem PCR-Produkt wurden ~500 ng auf silanierte Glas-Objektträger (Vantage Silanated Amine Slides; CEL Associates, Inc.) gedruckt (Kupsch *et al.* 2012). Die Oligonukleotide, die für die Herstellung des Tabak Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* verwendet wurden, sind bei Finster *et al.* (2013) gezeigt.

2.2.13.3 Extraktion von DNA bzw. RNA aus Immunopräzipitaten

Um DNA bzw. RNA aus den Immunopräzipitaten zu extrahieren, musste zunächst die Vernetzung von RpoA:HA und seinen Nukleinsäuren aufgehoben werden. Für die ChIP-Proben aus Pellet und Überstand erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 1 h. Für die RIP-Proben wurde ein optionaler Proteinase K (Fermentas) Verdau eingefügt. Dabei wurden Überstand und Pellet mit 4 mg/ml Proteinase K bei 55°C für 30 min inkubiert und anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms und gleichzeitige Inkubation bei 70°C für 1 h. Die DNA bzw. RNA aus Pellet- und Überstandfraktionen wurde zunächst mit 1% SDS und 5 mM EDTA (pH 8,0) sowie 7,5 µg/µl GlycoBlue™ *Coprecipitant* (Invitrogen) behandelt und dann mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1, v/v) extrahiert.

Zur Entfernung von RNA Kontaminationen in den DNA Proben wurde 0,5 mg/ml RNaseA hinzugefügt und bei RT für 15 min inkubiert. Die DNA wurde erneut mit phenolischer Extraktion und Ethanolfällung isoliert.

Um die RNA frei von DNA zu bekommen, wurde eine DNaseI Restriktion nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde die RNA erneut extrahiert wie oben beschrieben.

2.2.13.4 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung von RNA bzw. DNA aus der Pellet- und Überstandfraktion wurde mittels des ULS™ *aRNA labeling Kits* der Firma

KREATECH Diagnostics nach Herstellerprotokoll mit leichten Modifikationen durchgeführt. Gleiche Volumenanteile des Präzipitats und des Überstandes wurden zunächst mit 2 µl des 10 x *Labeling* Puffer versetzt und jeweils mit 1 µl von Cy5 (Pellet) oder Cy3 (Überstand) bei 85°C für 15 min markiert. Freier Farbstoff konnte mittels der Gelfiltrationssäulchen (*KREApure purification columns*, KREATECH Diagnostics) entfernt werden. Nach der Markierung wurden beide Proben aus Überstand und Pellet aus einer Immunopräzipitation vereint.

Das Volumen der Proben musste in einer Vakuumzentrifuge auf 10-15 µl eingeeengt werden. Abschließend wurden diese mit einem Volumen Hybridisierungspuffer versetzt.

Hybridisierungspuffer: 25 µl Formamid, 25 µl 20 x SSC (Kap. 2.1.4), 1 µl 10% SDS

2.2.13.5 Hybridisierung und Auswertung von *Microarrays*

Die *Microarray* Hybridisierung, das Scannen und die Datenauswertung erfolgte wie in Kupsch *et al.* (2012) beschrieben.

2.2.13.6 *Microarray* Analysen mit RNA aus TAC-Extrakten

Mit Hilfe von *Microarrays* lassen sich nicht nur Proben aus Immunopräzipitaten untersuchen, sondern auch RNAs oder DNAs aus verschiedenen Geweben, Mutanten oder auch aus TAC-Extrakten. Unterschiedliche RNAs aus den verschiedenen TAC-Extrakten (TACI, TACII und preTAC) wurden mittels Fluoreszenzmarkierung und Chip-Analysen nachgewiesen. Die RNA wurde wie unter Kap. 2.2.7.4 extrahiert und DNaseI behandelt. Die Konzentrationen wurden wie in Kap. 2.2.7.6 bestimmt und für die Markierung mit den Fluoreszenzfarbstoffen (Cy5 bzw. Cy3) 0,3-1 µg RNA der jeweiligen TAC-Fraktion eingesetzt. Dabei wurde Cy5 für TACI- bzw. TACII-RNA und Cy3 für preTAC-RNA eingesetzt. Zur Analyse der Varianzen wurde ein *dye-swap* als technisches Replikat durchgeführt, das heißt TACI und TACII wurden mit Cy3 und preTAC mit Cy5 markiert. Die Markierungsreaktion, Hybridisierung von *Microarrays* und die Auswertung erfolgte wie in Kap. 2.2.13.4 und 2.2.13.5 beschrieben.

2.2.14 Dotblot Analysen

Zur Verifizierung der ChIP-on-chip Analysen wurde die DNA aus der Immunopräzipitation aus Überstand- und Pelletfraktionen mittels Dotblot analysiert. Pro IP konnten sechs Replikate aus beiden Fraktionen auf eine Nylonmembran aufgetragen werden. Gleiche Volumenanteile der DNA aus Pellet- und Überstandfraktion wurden mit 480 µl *Blotting* Puffer (66% deionisiertes Formamid, 7,7% Formaldehyd, 1,3 x MOPS Puffer, pH 7,0) versetzt, anschließend für 15 min bei 75°C denaturiert und mit 180 µl 20 x SSC (Kap. 2.1.4) gemischt. Die Proben wurden auf eine Nitrozellulosemembran mittels einer Mikrofiltrationsapparatur (Bio-Dot® *SF Microfiltration Apparatus*, Bio-Rad) übertragen. Abschließend wurde die Membran mit 5 x SSC gewaschen, mit UV-Licht behandelt (150 mJ/cm², GS-Gene Linker® UV-Kammer, Bio-Rad) und mit radioaktiv markierten PCR-Produkten hybridisiert (siehe auch Kap. 2.2.9).

2.2.15 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription handelt es sich um die Übersetzung der RNA Sequenzen in cDNA Sequenzen. Hierfür wurde die Superscript® III *Reverse Transcriptase* (Invitrogen) verwendet.

Aus den TAC-Fractionen wurde zunächst RNA isoliert (siehe Kap. 2.2.7.4) und mittels DNaseI die DNA enzymatisch, den Herstellerangaben folgend, entfernt. 2-5 µg RNA wurden erneut über eine phenolische Extraktion und Ethanolfällung extrahiert und in 12 µl RNase-freiem *Aqua bidest.* resuspendiert. Die reverse Transkription erfolgte unter Anwesenheit von 2 pmol genspezifischen Primern, 0,5 mM dNTPs, 1 x Reaktionspuffer, 5 mM DTT, 100 U Superscript® III Reverse Transkriptase. Bei den genspezifischen Primern handelte es sich um ein 1:1 Gemisch von Primern die in Tabelle 6, Anhang 2 zu finden sind. Die cDNA wurde mittels PCR analysiert und resultierende PCR-Produkte wurden von der Firma SMB (Services in Molecular Biology GmbH) sequenziert.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Lokalisation der plastidären Transkriptions- und Translationsmaschinerie

3.1.1 Markierung von *rpoA* mit einer HA-Epitopsequenz

Die Detektion und die Anreicherung von plastidären Proteinen kann durch die Markierung nativer Proteinsequenzen mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop ermöglicht werden (Zoschke *et al.* 2010). Die Verwendung von sensitiven und hochspezifischen Antikörpern gegen dieses HA-Epitop ermöglicht diverse für diese Arbeit geplante immunologische Analysen (Western, Immunopräzipitation, Analyse kopräzipitierter RNA und DNA). Folgeexperimente, wie z.B. die Immunopräzipitation, erlauben eine ausschließliche, spezifische Anreicherung des zu untersuchenden Proteins. Die alpha-Untereinheit der plastidär kodierten plastidären RNA Polymerase konnte bereits durch Plastidentransformation stabil mit dem Epitop markiert werden (Bachelorarbeit von Erik Eggert). Der C-Terminus der RpoA Untereinheit war für die Transformation geeignet. Stromabwärts folgt eine größere intergenische Sequenz, welche die Insertion des HA-Epitops und der Selektionskassette *aadA* ermöglicht, ohne eine Verschiebung des Leserasters von *rpoA* und weiter stromabwärts gelegener Gene zu verursachen.

Das Design der Transformationsvektoren für den transplastomischen Ansatz ist in Abb. 4 dargestellt. Um die Integration des HA-Epitops in das Plastom durch homologe Rekombination zu gewährleisten, wurde der modifizierte *rpoA* C-Terminus mit langen ca. 600-1000 bp stromauf- und stromabwärts flankierenden Sequenzen versehen, die homolog zu der Integrationsstelle sind. Die Grenzen des Inserts sind jeweils mit einem Sternchen in Abb. 4 markiert. Um den Einfluss des Resistenzmarkers *aadA* auf den Phänotyp der transformierten Tabakpflanzen zu prüfen, wurden zusätzlich Kontrollvektoren erstellt, welche die *aadA*-Sequenz, nicht jedoch das HA-Epitop enthalten. Beide Vektoren wurden für die stabile Transformation in Tabak eingesetzt (Svab und Maliga 1993).

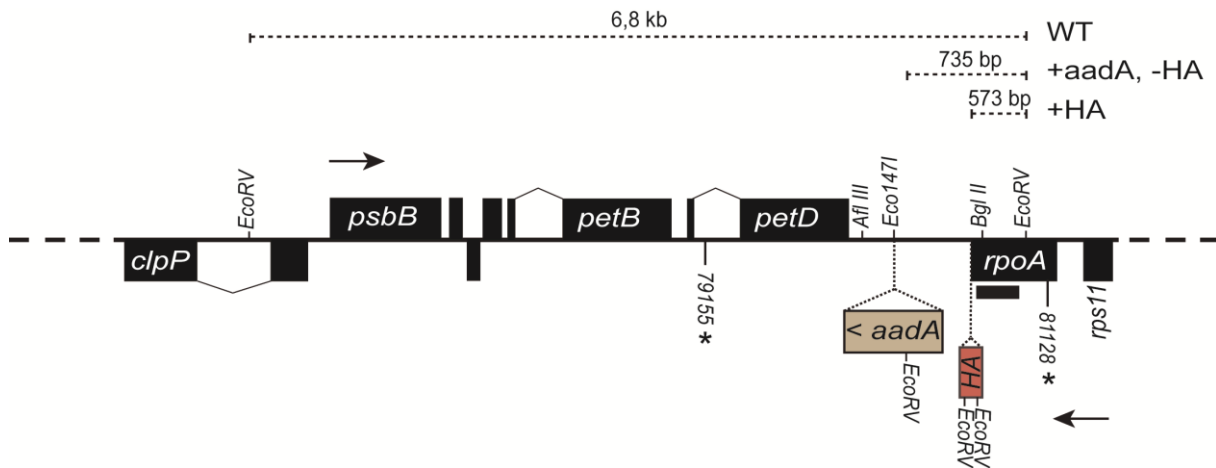


Abb. 4: Genkarte der *rpoA*-Region von *Nicotiana tabacum* und Integration einer HA-Epitopsequenz sowie eines Resistenzmarkers C-terminal von *rpoA*. Exons werden als schwarze und die Insertionen (*aadA* und *HA*) als farbige Rechtecke gezeigt. Nichtkodierende Bereiche sind durch schwarze Linien und Introns durch dünne Linien, welche die Exons verbinden, repräsentiert. Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. Sternchen markieren die Grenzen des Plasmidfragments im Transformationsvektor. Die Zahlen entsprechen den Positionen im Tabakplastom (Akzession NCBI: NC_001879.2). *aadA* = Resistenzmarker (< = Transkriptionsrichtung), *HA* = Hämagglutinin-Epitopsequenz. *AflIII*, *Eco147I*, und *BglII* = Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung des Transformationsvektors relevant waren. *EcoRV* = erforderliche Schnittstellen für Southern Analysen. Der schwarze Balken unterhalb von *rpoA* kennzeichnet die Position der *rpoA* Sonde für die Southern Hybridisierungen. Gestrichelte Linien deuten Restriktionsfragmente mit ihren erwarteten Größen nach *EcoRV* Restriktion in Southern Analysen an.

3.1.2 Segregationsstatus der transplastomischen Pflanzen

Die Organellen besitzen polyploide Genome, weshalb nach der Transformation meist nur einige wenige Plastome die Vektoren aufgenommen haben. Diese können sich zwar unter Selektionsdruck durch Antibiotika weiter ausbreiten, dennoch muss der Segregationsstatus (hetero- oder homoplastomisch) der hervorgegangen Sprösslinge stets überprüft werden. Homoplastomie besteht, wenn die Pflanzen nur eine Art von Plastomen enthalten (z.B. nur Transplastome). Heteroplastomische Pflanzen tragen dagegen verschiedene Plastome (z.B. Transplastome und wildtypische Plastome).

Da mehrere Regenerationsrunden unter Selektionsdruck die Segregation der Transplastome beschleunigen (Maliga 2004), wurden nach zwei bis vier Runden auf RMOP-Medium die grünen Sprösslinge zunächst mittels PCR auf die Integration der *aadA*-Kassette und des *HA-Tags* untersucht (Daten nicht gezeigt, Bachelorarbeit von Erik Eggert). Für den Kontrollvektor (*aadA* - *rpoA:HA*) konnte bisher keine

Transformante generiert werden, vermutlich begründet durch eine Mutation der Resistenzkassette. Die Sprösslinge der *RpoA*:HA Transformanten wurden auf Erde umgesetzt und die Prüfung des Segregationsstatus der HA-Epitopsequenz erfolgte durch Southern Analysen in der F1 Generation der verschiedenen Linien (s. Abb. 5).

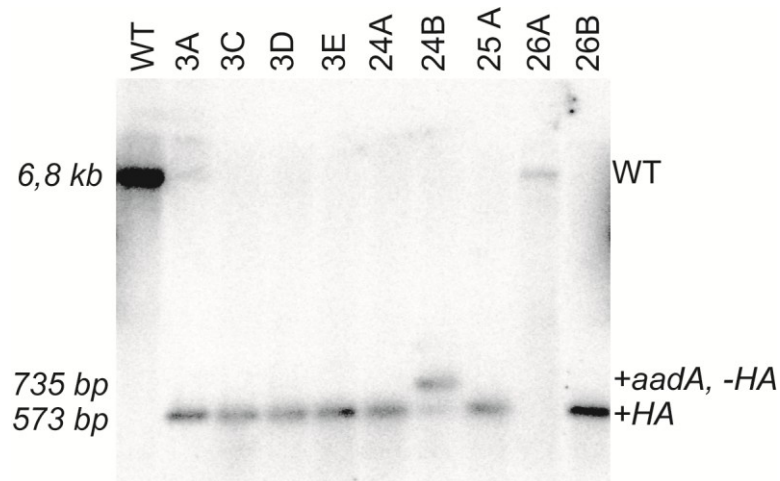


Abb. 5: Test des Segregationsstatus in transplastomischen Tabaklinien mittels Southern Hybridisierung. Gesamt-DNA wurde mit *EcoRV* verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit einer *rpoA*-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Position der Sonde, die Restriktionsstellen sowie die Fragmentgrößen sind in Abb. 4 eingezeichnet. Die Signale der *EcoRV* Restriktionsfragmente korrelieren mit den berechneten Größen aus Abb. 4. Demnach sind vier unabhängige Linien (3 (A, C, D, E), 24 A, 25 A, 26 B; Buchstaben beziehen sich dabei auf Klone einer einzigen transplastomischen Linie) homoplastomisch für den HA-Tag. WT = Wildtypkontrolle.

Die Southern Hybridisierungen zeigen die relative Anreicherung von Wildtyp und transplastomischen Allelen für jede erzeugte Linie. Es konnten vier unabhängige Linien (3 (A, C, D, E); 24 A; 25 A; 26 B) detektiert werden, die für *rpoA*:HA homoplastomisch waren. Die Größen der Restriktionsfragmente korrelieren mit den nach der Insertion des Konstrukts zu erwartenden Größen. Die Linie 26 A wies kein HA-Signal auf und entspricht demnach dem Wildtyp (WT). Des Weiteren wurde nach der Transformation mit *rpoA*:HA eine heteroplastomische Transformante erhalten, die neben dem erwarteten Rekombinationsprodukt mit HA-Epitopsequenz und der *aadA*-Kassette ein weiteres Signal aufwies (24 B, Signal bei 735 bp, Abb. 5). Dies lässt sich wahrscheinlich durch Rekombinationsereignisse zwischen den Insertionen (zwischen *aadA* und *HA*) erklären. Dennoch konnte diese Linie nicht als Kontrolle für die Prüfung des Einflusses des Resistenzmarkers dienen, da sie heteroplastomisch

für *rpoA:HA* war (enthielt Transplastome für *aadA* + *rpoA:HA*, schwaches Signal bei 573 bp, und *aadA* - *rpoA:HA*, Signal bei 735 bp, Abb. 5).

Mit Keimungstests auf selektivem Medium konnte der Segregationsstatus der *aadA*-Kassette in den Keimlingen der F1 Generation der homoplastomischen Pflanzen bestätigt werden (Abb. 6). Auf Spectinomycin-haltigem Medium können nur die Samen homoplastomischer Pflanzen grüne Keimlinge hervorbringen. Die Nachkommen von wildtypischen Pflanzen erscheinen ausschließlich weiß, während die der heteroplastomischen Pflanzen in grünen, weißen und grün/ weiß gescheckten Keimlingen resultieren. Es wurden je ~1000 Keimlinge der F1 Generation der *rpoA:HA* Linien vergleichend mit WT Pflanzen selektiv kultiviert (exemplarisch für eine Linie in Abb. 6 gezeigt). Kein einziger Keimling der F1 *rpoA:HA* Linien wies eine gebleichte Farbe auf, was für die Homoplastomie bezüglich der *aadA*-Kassette spricht. Im Folgenden werden die Linien, die den HA-Tag und die *aadA*-Kassette tragen als RpoA:HA bezeichnet. Für alle folgenden Experimente wurden ausschließlich homoplastomische Pflanzen verwendet.

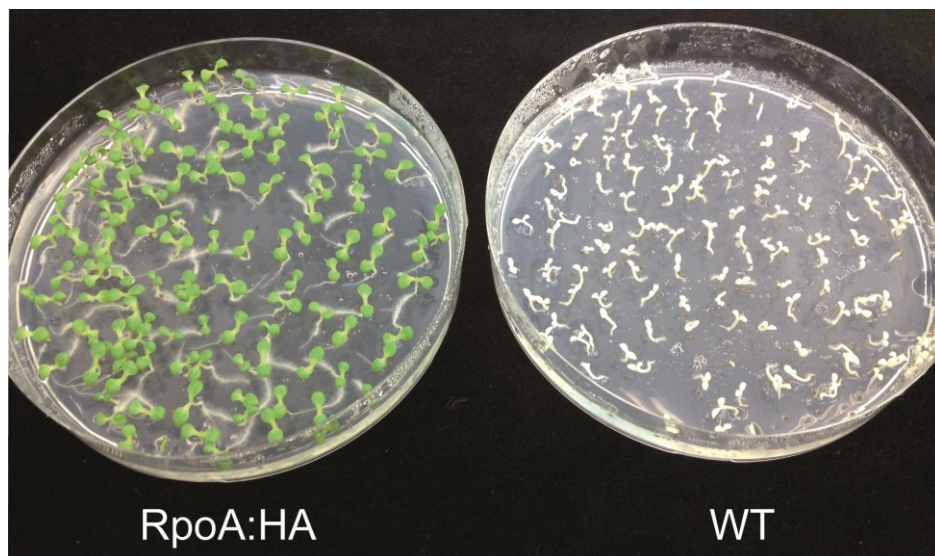


Abb. 6: Vererbung der Spectinomycin Resistenz einer geselbsteten RpoA:HA F1 Linie. Zur Demonstration der Homoplastomie der transformierten Linien in Bezug auf *aadA* wurden die Samen unter selektiven Bedingungen zur Keimung gebracht. Kein einziger bleicher Keimling konnte unter ~1000 untersuchten Samen jeder Linie entdeckt werden. Als Kontrolle wurden WT Samen selektiv auf Spectinomycin-haltigem Medium kultiviert, was ausschließlich in weißen Jungpflanzen resultierte. RpoA:HA = Linien mit C-terminalem HA-Tag an *rpoA* und *aadA* Kassette, WT = Wildtyp.

3.1.3 Phänotyp der homoplastomischen RpoA:HA Pflanzen

Der makroskopische Phänotyp aller homoplastomischen Tabakpflanzen, die auf Erde herangezogen wurden, wies keine Unterschiede im Vergleich zu WT Pflanzen auf (s. Abb. 7). Das legt die Vermutung nahe, dass sowohl die HA-Epitopsequenz als auch die Resistenzkassette keinen Einfluss auf die Funktion von RpoA bzw. die plastidär kodierte RNA Polymerase haben. Verluste von *rpoA* und anderen PEP Untereinheiten (*rpoB*, *rpoC1*) resultieren in albinotischen Pflanzen (De Santis-Maciossek *et al.* 1999).



Abb. 7: Exemplarischer Phänotyp der mit HA-markierten RpoA Tabakpflanze und einer WT Tabakpflanze. Auf Erde gewachsene, homoplastomische transgene Pflanzen unterscheiden sich phänotypisch nicht vom WT. Abkürzungen wie in Abb. 6.

3.1.4 Entwicklungsabhängige Expression von RpoA:HA

Bisher liegen keine quantitativen Daten zur entwicklungsabhängigen Expression der einzelnen PEP Untereinheiten vor. Erste immunologische Analysen in *Arabidopsis*- und Spinat-Proteinextrakten mit Antikörpern gegen Untereinheiten der *E. coli* RNA Polymerase konnten während der frühen Pflanzenentwicklung die PEP Untereinheiten nachweisen (Demarsy *et al.* 2006). Allerdings lässt die geringe zeitliche Auflösung keine Aussage über die entwicklungsabhängige Expression zu.

Ergebnisse

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des epitopmarkierten RpoA Proteins in verschiedenen Entwicklungsstufen durch quantitative Western Analysen mit einem HA-spezifischen Antikörper (Sigma) untersucht (s. Abb. 8).

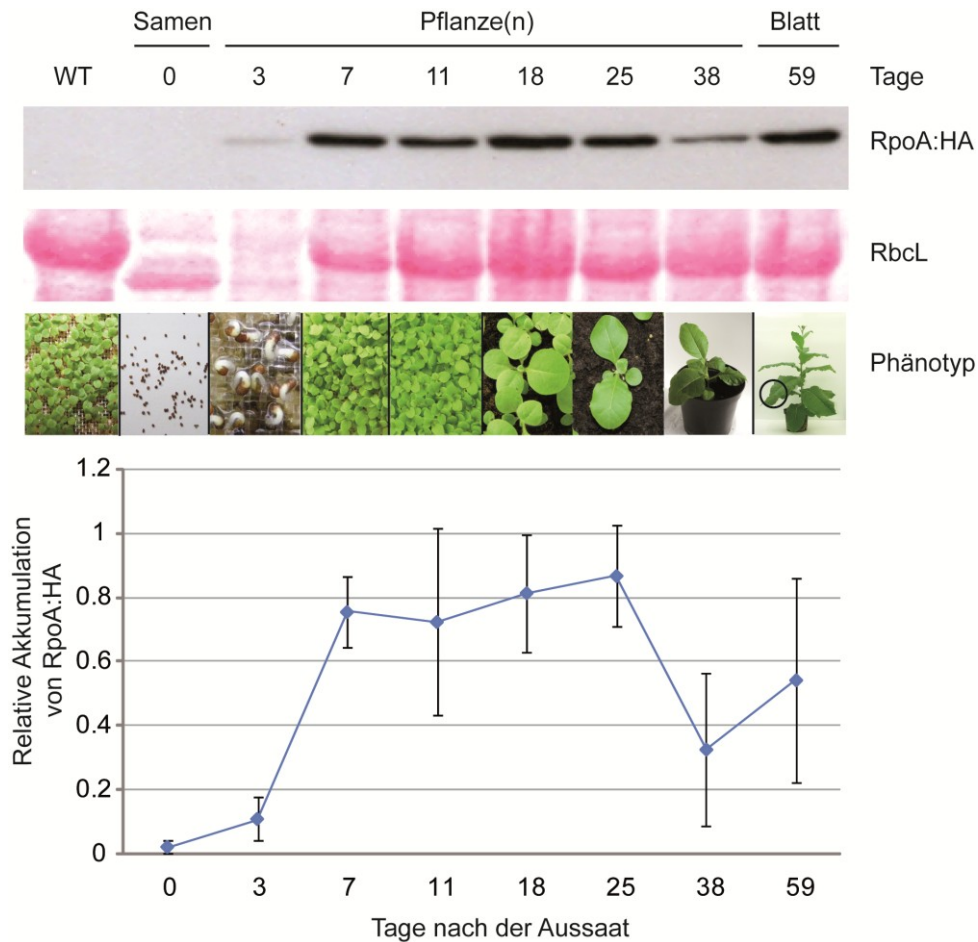


Abb. 8: Entwicklungsabhängige Expression des rekombinanten RpoA:HA Proteins in Tabakpflanzen. Gleiche Mengen des Gesamtproteins aus Samen, Pflanzen unterschiedlichen Alters und Blättern wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit einem spezifischen HA-Antikörper (Sigma) hybridisiert. Von oben nach unten: Immunologische Detektion von RpoA:HA mit dem HA-AK. Die gleiche Membran wurde mit Ponceau S gefärbt und ein Ausschnitt ist als Beladungskontrolle gezeigt. Die große Untereinheit der RuBisCo (RbcL) konnte in grünem Gewebe, nicht aber in den Samen oder drei Tage alten Keimlingen detektiert werden. Weiter unten: Exemplarische Phänotypen der verschiedenen alten Pflanzen, die für die Proteinextraktion genutzt wurden. Der schwarze Kreis markiert das Blatt, das für die Analyse 59 Tage alter Pflanzen verwendet wurde. Unten: Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale von drei Western Analysen (Bio-Rad Chemilmager und Quantity-One-Software). Die Signale wurden jeweils auf den Maximalwert jedes Einzelerperiments normalisiert und gegen das Alter der Pflanzen aufgetragen. Standardabweichungen sind als vertikale Linien eingezeichnet.

Die Akkumulation von RpoA:HA wurde über 59 Tage während der Pflanzenentwicklung beobachtet. Das Signal für das HA-markierte RpoA Protein migrierte in der SDS-PAGE bei ca. 41 kDa. Dies korreliert mit der berechneten Größe (RpoA ~38 kDa und HA-Epitop ~3 kDa). Keine Expression für RpoA:HA konnte in den trockenen Samen (0 Tage) nachgewiesen werden. Bereits drei Tage nach der Aussaat konnte eine Akkumulation des epitopmarkierten RpoA Proteins detektiert werden. Die RpoA:HA Proteinmenge steigt graduell mit späteren Entwicklungsphasen und erreicht die stärkste Anreicherung zwischen sieben und 25 Tagen während der Pflanzenentwicklung. Die Expression in grünem Pflanzengewebe bleibt nahezu konstant. In älteren Pflanzen (38 und 59 Tage) verringert sich die Proteinmenge auf weniger als die Hälfte des Maximalwertes. RpoA:HA akkumuliert in den ausgewachsenen Blättern von 59 Tage alten Pflanzen allerdings stärker als in 38 Tage alten Pflanzen. Dieser Effekt kann jedoch auf Unterschieden in der Probennahme beruhen: Nach 38 Tagen wurden ganze Pflanzen untersucht. Nach 59 Tagen wurde dagegen ein ausgewachsenes Blatt für die Proteinextraktion verwendet. Als Kontrolle diente ein WT Proteinextrakt von 7 Tage alten Pflanzen. Das Fehlen eines Signals im WT demonstriert die hohe Spezifität des HA Antikörpers.

Neben der entwicklungsabhängigen Expression wurde die Akkumulation von RpoA:HA in etiolierten Tabakpflanzen untersucht (Abb. 9 A). Dabei wurden Pflanzen ohne Licht für zehn Tage auf wassergesättigtem Vermiculit angezogen (Abb. 9B). Die qualitative Western Analyse zeigt ein Signal für RpoA:HA in nicht-photosynthetisch aktiven Etioplasten. Das lässt vermuten, dass die PEP wahrscheinlich auch eine wichtige Rolle bei der Keimung und in nicht-photosynthetisch aktiven Plastiden spielt wie es schon von Demarsy *et al.* 2006 postuliert wurde.

Inwieweit RpoA einer zirkadianen Rhythmik unterliegt, wurde über einen Zeitraum von 56 Stunden untersucht. Dabei wurden die Pflanzen unter Standardbedingungen für sieben Tage angezogen und Gesamtproteinextrakte mittels Western Analysen in einem Abstand von zwei Stunden untersucht. Die Expression von RpoA:HA unterliegt keinen starken Fluktuationen während des beobachteten Zeitraums in Abhängigkeit des Tag- und Nacht-Rhythmus (siehe Abb. 30, Anhang 1).

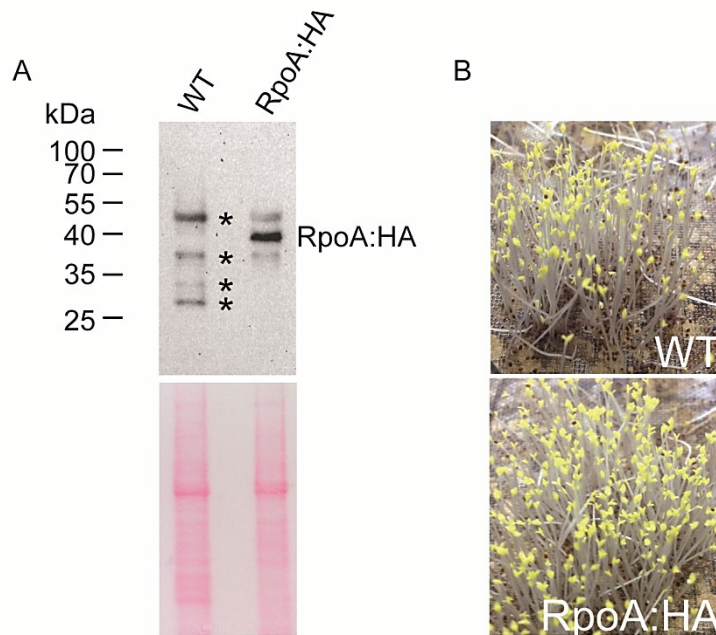


Abb. 9: Immunologische Analyse von RpoA:HA in etiolierten Tabakpflanzen. (A) Gleiche Mengen Gesamtprotein aus etiolierten Tabakpflanzen wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem spezifischen HA-AK hybridisiert. Sternchen markieren Kreuzhybridisierungen des HA-AK. Unterhalb des Chemiluminogramms ist die Ponceaufärbung der gleichen Membran als Beladungskontrolle gezeigt. (B) Phänotypen der etiolierten Tabakpflanzen.

3.1.5 RpoA lokalisiert in den Membranen der Chloroplasten

Proteomische Analysen von Nukleoiden und TAC-Komplexen zeigen, dass die Kernkomponenten der PEP in diesen membranassoziierten Komplexen zu finden sind (Little und Hallick 1988, Majeran *et al.* 2012, Sato 2001, Sato *et al.* 2003, Suck *et al.* 1996). Die PEP konnte zusätzlich auch lösliche Form isoliert werden (Steiner *et al.* 2011, Pfalz und Pfannschmidt 2013). Wie aber die genaue suborganelläre Verteilung der PEP unter verschiedenen Bedingungen aussieht, ist nicht bekannt. Daher wurden Chloroplastenmembranen und Stroma aus sieben Tage alten Pflanzen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen isoliert und die Verteilung von RpoA:HA im Chloroplasten mittels Western Analysen überprüft (siehe Abb. 10).

Die Pflanzen wurden entweder unter Standardbedingungen (im Folgenden als Lichtbedingungen bezeichnet) für sieben Tage mit einem 16 h Licht/ 8 h Dunkelheit Zyklus angezogen und morgens nach 1 h Belichtung geerntet, oder sie wurden für

Ergebnisse

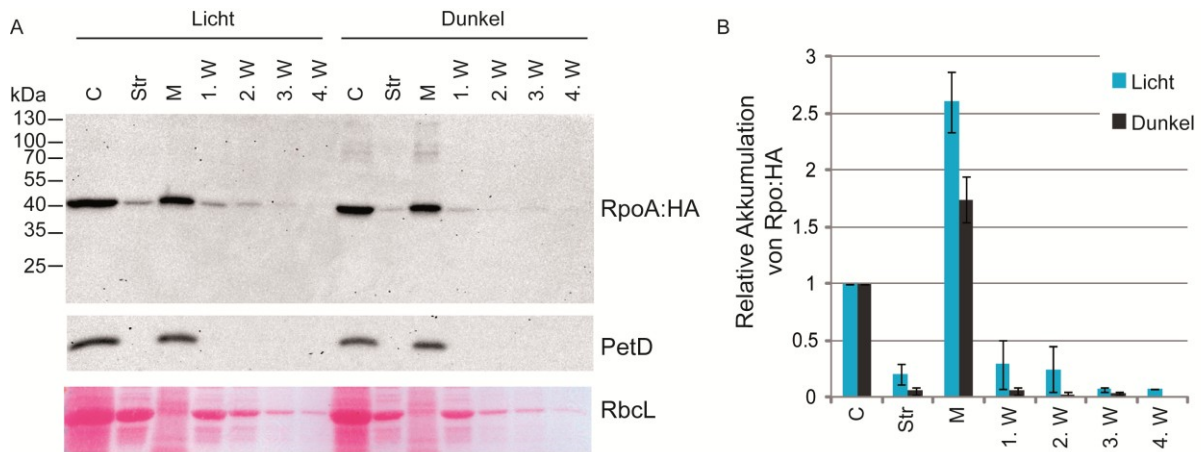


Abb. 10: Lokalisierung des epitopmarkierten RpoA in Tabakchloroplasten während der Licht- und Dunkelperiode. Lichtbedingungen: Pflanzen wurden für sieben Tage unter Standardbedingungen angezogen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit, 27°C). Dunkelbedingungen: Pflanzen wurden sechs Tage unter Standardbedingungen angezogen und für 16 h in der Dunkelheit adaptiert. Die Chloroplasten wurden lysiert und in Membran- und Stromabestandteile separiert. (A) Gleiche Mengen von Gesamtchloroplasten, Stroma und Membranen, sowie der Waschfraktionen der Membranen wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem spezifischen HA-AK hybridisiert. Oben: Immunologische Detektion von RpoA:HA, Mitte: Immunologische Detektion von PetD auf der gleichen Membran, Unten: Ponceau S Färbung der gleichen Membran zur Visualisierung von RbcL und als Beladungskontrolle. (B) Die Chemilumineszenzsignale aus (A) für RpoA:HA wurden quantifiziert (Bio-Rad Chemilmager und Quantity-One-Software). Das Diagramm basiert auf zwei biologischen Replikaten und die Signale wurden auf die Gesamtchloroplastenextrakte für jedes Experiment normiert. Standardabweichungen sind als vertikale Balken eingezeichnet. C = Gesamtchloroplasten, Str = Stroma, M = Membranen, 1., 2., 3., 4. W = erste, zweite, dritte und vierte Waschung der Membran.

sechs Tage unter Standardbedingungen angezogen und dann 16 h vor der Ernte vollständiger Dunkelheit ausgesetzt (im Folgenden als Dunkelbedingungen bezeichnet). Ein spezifisches Signal für RpoA konnte im Stroma, in den Waschfraktionen sowie in den Membranen detektiert werden (Abb. 10 A). Durchschnittlich ist aber die Anreicherung von RpoA:HA in der Membranfraktion 23-mal stärker als in der Stromafraktion (Abb. 10 B). Um mögliche Kontaminationen von stromalen Proteinen in der Membranfraktion zu vermeiden, wurden diese mehrmals mit Extraktionspuffer gewaschen. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch Hybridisierung der gleichen Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper gegen das membranassoziierte PetD-Protein bestätigt (detektiert die Proteinuntereinheit IV des Cytochrom-*b₆f*-Komplex, Stoppel und Meurer 2013; freundlicherweise von Prof. Dr.

Alice Barkan zur Verfügung gestellt, Abb. 10 A). Des Weiteren ist in der Ponceau Färbung der gleichen Membran die große Untereinheit des abundanten Stromaproteins RuBisCO (RbcL) im Stroma, nicht jedoch in der Membran zu finden (Abb. 10 A). Es gibt keinen Unterschied in der Verteilung und Expression von RpoA:HA zwischen Licht- und Dunkelbedingungen. Zusammenfassend ist RpoA also hauptsächlich mit der Membran von Chloroplasten assoziiert, ein kleinerer Teil liegt löslich im Stroma vor und Licht hat keinen Einfluss auf diese Verteilung.

3.1.6 DNA-unabhängige Membranassoziation in jungem Gewebe

Seit bekannt wurde, dass der Transkriptionsapparat der Chloroplasten und die plastidäre DNA mit den Membranen assoziiert sind (Karcher *et al.* 2009, Sato 2001, Sato *et al.* 2003, Schweer *et al.* 2010), wird vermutet, dass auch die PEP über einfache DNA Halterungen mit der Membran der Chloroplasten verankert ist. Um diese Hypothese zu testen, wurden Chloroplastenmembranen aus jungen, sieben Tage alten und bereits blühenden 60 Tage alten Pflanzen fraktioniert und in Extraktionspuffer gelöst. Wenn RpoA mit Membranen über die DNA assoziiert ist, sollte das rekombinante mit HA markierte RpoA Protein nach der Behandlung mit DNaseI (Firma Roche) und anschließender Zentrifugation in der Überstandsfraction zu finden sein. Die Verteilung von RpoA:HA in Überstand- und Pelletfraktionen wurde mittels qualitativer Western Analysen und dem spezifischen HA-Antikörper untersucht (siehe Abb. 11 A).

In den sieben Tage alten Keimlingen führte die DNaseI Behandlung allerdings nicht zu einer signifikanten Freisetzung von RpoA:HA. Die Signale für das rekombinante Protein waren gleich stark in den Überstandsfractionen der DNaseI behandelten (+) und der unbehandelten (-) Gewebeproben (Abb. 11 A, links). In 60 Tage alten Pflanzen konnte dagegen eine beträchtliche Menge des membrangebundenen RpoA:HA solubilisiert werden (Abb. 11 A, rechts).

Für den Nachweis des erfolgreichen DNaseI Verdaus wurde zunächst die DNA aus DNaseI behandelten (+) und unbehandelten (-) Pellet- sowie Überstandfraktionen von sieben und 60 Tage altem Membrangewebe isoliert. Durch die Amplifikation eines plastidären Genfragments (*psbA*, kodiert für das D1 Protein des Photosystem II) mittels PCR konnte die Effektivität des DNaseI Verdaus bestätigt werden. Die DNA aus den Überstand- und Pelletfraktionen DNaseI behandelte und unbehandelte

Proben wurde mit den genspezifischen Primern *psbA* fw und *psbA* rev (siehe Tab. 6, Anhang 2) amplifiziert und das Genfragment mit der Gelelektrophorese überprüft (Abb. 11 B). Lediglich in dem unbehandelten Membrangewebe von sieben und 60 Tage alten Pflanzen konnte das Genfragment mit einer erwarteten Größe von 376 bp detektiert werden. In den DNaseI behandelten Proben konnte kein Signal für *psbA* ermittelt werden, was die erfolgreiche Eliminierung plastidärer DNA bestätigte. Die Überprüfung der PCR und Reinheit der Primer erfolgte mit Tabak Gesamtchloroplasten DNA als positiv und Wasser als negativ Kontrolle.

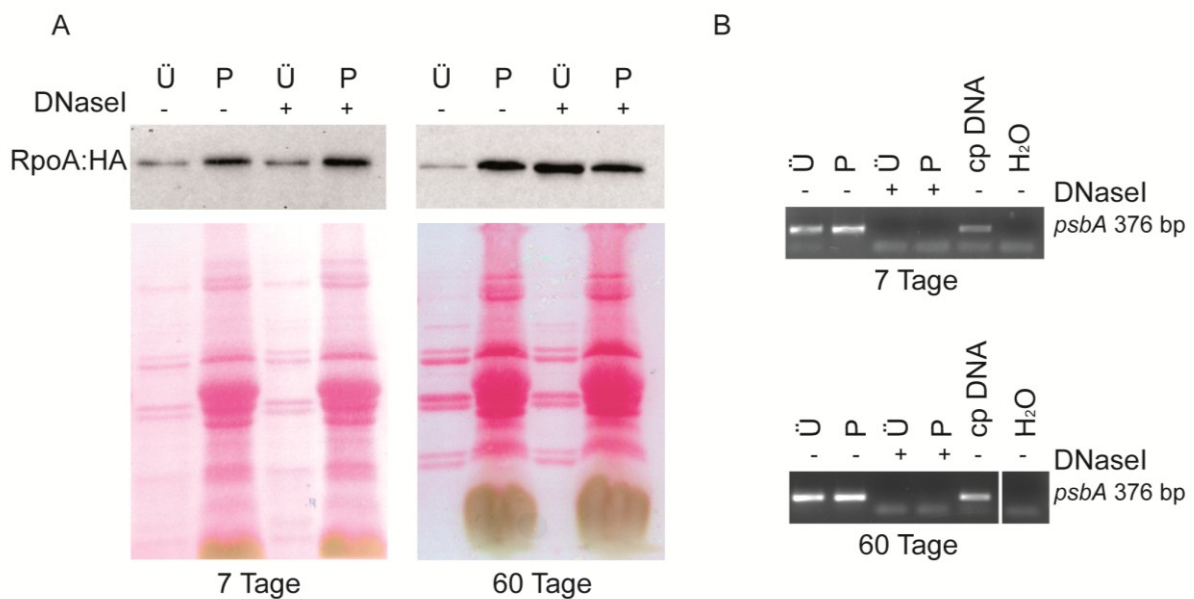


Abb. 11: Analyse der DNA-abhängigen Membrananhaftung von RpoA:HA in jungen und alten Tabak Chloroplasten. Membranfraktionen von Chloroplasten wurden aus sieben und 60 Tage alten Pflanzen isoliert und in Extraktionspuffer resuspendiert. Aliquots wurden für eine Stunde mit 200 U DNaseI (+) oder ohne DNaseI (-) bei RT inkubiert. Unlösliche Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. (A) Mittels SDS-PAGE wurden gleiche Aliquots der gesamten Überstand- und Pelletfraktion aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit dem HA-AK hybridisiert. Oben ist das Chemiluminogramm von RpoA:HA dargestellt und unten die Färbung der gleichen Membran mit Ponceau S. (B) Nachweis der DNA Eliminierung von Membranfraktionen durch PCR. DNA aus unlöslichen Membranen (P) und dem Überstand (Ü) wurden isoliert. PCR Analysen von *psbA* mit der DNA aus DNaseI behandelten (+) und unbehandelten (-) Überstand- und Pelletfraktionen wurden durchgeführt. Ein 376 bp großes Fragment wurde amplifiziert. Irrelevante Spuren wurden ausgeschnitten und sind durch einen vertikalen weißen Strich gekennzeichnet. cpDNA = chloroplastidäre DNA, H₂O = Wasserkontrolle, Ü = Überstandfraktion nach Zentrifugation, P = Pelletfraktion nicht-löslicher Membranen.

Da RpoA:HA nach erfolgreichem DNaseI Verdau in jungem Gewebe nicht in den Überstandfraktionen sondern hauptsächlich in der Pelletfraktion zu finden war, scheint RpoA bzw. die PEP DNA-unabhängig mit der Membran assoziiert zu sein. Im Gegensatz dazu verändert sich diese Verteilung in älteren Blattgeweben nach der Degradation der DNA. RpoA:HA konnte durch die DNaseI Behandlung solubilisiert werden, was eine DNA-abhängige Assoziation mit der Membran andeutet. Zusammenfassend legen diese Ergebnisse eine entwicklungsabhängige Verankerung des RpoA:HA Proteins und wahrscheinlich auch der gesamten PEP über die DNA an die Membranen der Chloroplasten nahe.

3.1.7 Die PEP Kernuntereinheiten assoziieren mit RpoA:HA

Die Position des HA-Epitops im Plastom wurde so gewählt, dass es nicht mit Sequenzelementen interferiert, die wichtig für die *rpoA* Expression und Funktion sind. Um zu zeigen, dass das rekombinante HA-markierte RpoA Protein Teil eines größeren PEP Komplexes ist, wurde es mittels des spezifischen HA-Antikörpers präzipitiert (Immunopräzipitation) und die assoziierten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (Invitrogen) analysiert (s. Abb.12).

Es konnte ein Protein mit einer molekularen Masse von 41 kDa in den Immunopräzipitaten der transplastomischen Pflanzen, nicht aber in WT Pflanzen detektiert werden. Die Größe dieses Proteins entspricht der berechneten Größe des RpoA:HA Fusionsproteins. Weitere Signale, die nur in den transplastomischen Pflanzen nachgewiesen wurden, entsprechen in ihrer Größe den anderen PEP Kernuntereinheiten RpoB (121 kDa), RpoC1 (79 kDa) und RpoC2 (157 kDa). Das Signal für RpoA:HA war stärker als die der anderen Kernkomponenten der PEP, was sich durch die Stöchiometrie des Enzyms erklären lässt. Das PEP Enzym enthält zwei RpoA-Untereinheiten, wohingegen RpoB, RpoC1 und RpoC2 jeweils nur einmal vorkommen (α_2 , β , β' , β'' , Weihe *et al.* 2012).

Darüber hinaus wurden 9 weitere potentielle Komplexpartner der PEP gefunden (Abb. 12, Signale 3-5, 7-9 und 11-13). Hierbei könnte es sich um bekannte PEP-assoziierte Faktoren, wie den PEP-assoziierten Proteinen (PAPs) oder pTACs (plastidäres transkriptionsaktives Chromosom assoziierte Proteine) handeln (Pfalz *et al.* 2006).

Ergebnisse

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es möglich ist mit transplastomisch markierten RpoA Protein einen Komplex zu immunopräzipitieren der mindestens dem PEP Kernkomplex entspricht, der bereits in früheren Studien durch alternative, biochemische Untersuchungen angereichert wurde (Suzuki *et al.* 2004, Steiner *et al.* 2011). Die Präzipitation des PEP Komplexes ermöglicht die Identifikation von PEP-assoziierten Nukleinsäuren (DNA und RNA) durch Analyse von Protein-Nukleinsäure-Kopräzipitaten (siehe Kap. 3.1.9).

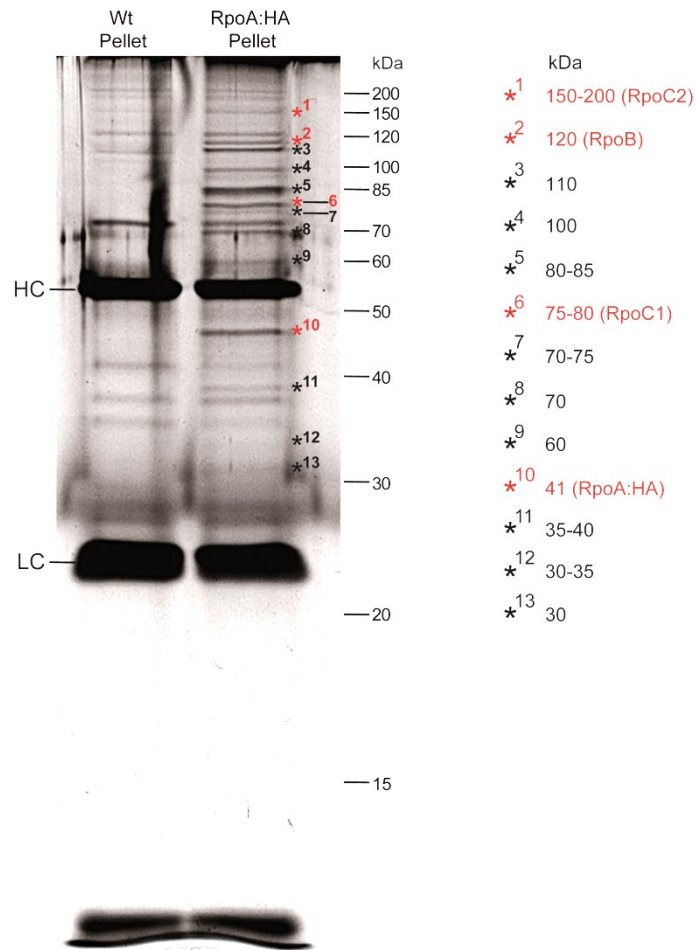


Abb. 12: Proteine die mit HA-markierten RpoA kopräzipitieren. Um RpoA-assoziierte Proteine in der Immunopräzipitation zu untersuchen, wurde das rekombinante RpoA Protein aus Membranfraktionen der Chloroplasten mit dem spezifischen HA-AK präzipitiert. Die Proteine der Präzipitate der RpoA:HA Linie und die der WT Kontrolle wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (Invitrogen). Proteine, die nur in den RpoA:HA Pellets zu finden waren, sind mit einem Sternchen markiert und deren molekulare Größe ist auf der rechten Seite abgebildet. Die Kernuntereinheiten der PEP sind mit roten Sternchen gekennzeichnet. Das mit HA markierte RpoA Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 41 kDa (abgeleitet von den Sequenzen). Die molekulare Masse der anderen PEP Komponenten beträgt 121 kDa (RpoB), 79 kDa (RpoC1) und 157 kDa (RpoC2). HC, LC = *heavy chain* (schwere Kette) und *light chain* (leichte Kette) des Antikörpers.

3.1.8 Immunopräzipitation von RpoA:HA

Anhand immunologischer Untersuchungen (s. Kap.3.1.5) konnte gezeigt werden, dass RpoA:HA hauptsächlich mit den Membranen der Chloroplasten assoziiert und dies die Immunopräzipitation (IP) verkompliziert, wie sie für stromale epitopmarkierte Proteine bekannt ist (Zoschke *et al.* 2010). Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, konnte RpoA:HA erfolgreich aus Membranfraktionen mit Hilfe des HA-spezifischen Antikörpers präzipitiert werden. Um die Qualität einer IP bewerten zu können wurden Western Analysen ausgeführt. Für die Identifikation der mit PEP *in vivo* assoziierten Nukleinsäuren unter verschiedenen Lichtbedingungen wurde ein erst kürzlich etabliertes Protokoll für die Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) in Chloroplasten modifiziert (Newell und Gray 2010).

Die Pflanzen wurden für sieben Tage unter Standardbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit, 27°C) für die Chloroplastenisolation angezogen und am Tag der Präparation für eine Stunde belichtet. Chloroplasten wurden extrahiert und mit Formaldehyd versetzt zur Erhaltung des PEP-Nukleinsäure-Komplexes. Für die IP mit dem HA-spezifischen Antikörper (Sigma) wurden solubilisierete Membranfraktionen der gecrosslinkten Chloroplasten eingesetzt (siehe auch Material und Methoden Kap. 2.2.13.1). Eine Ultraschallbehandlung ermöglichte die Fraktionierung von langen DNA Molekülen auf ca. 500 bp. Damit wurde die Präzipitation des Protein-DNA Komplexes erleichtert. Zur Visualisierung der Fraktionierung wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abb. 13).

Die anschließende immunologische Analyse der Überstand- und Pelletfraktion zeigte, dass RpoA:HA in der solubilisierten Membranfraktion (Input) vorhanden war und aus chloroplastidären Membranen präzipitiert werden konnte (Abb. 14, linke Seite). Mit Sternchen markierte hochmolekulare Signale sind spezifisch für HA-markierte RpoA Linien. Durch den initialen *Crosslink* mit Formaldehyd werden nicht nur Proteine mit DNA vernetzt sondern auch Proteine untereinander. Solche irreversiblen Komplexbildungen von RpoA mit anderen Proteinen könnten das Zustandekommen dieser Signale erklären.

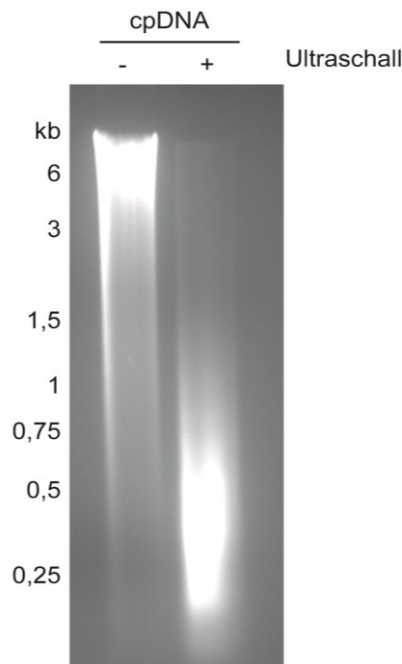


Abb. 13: Fragmentlänge chloroplastidärer DNA vor und nach der Ultraschallbehandlung. Chloroplastenmembranen wurden isoliert, mit NP-40 solubilisiert und mit Ultraschall behandelt, wie in Material und Methoden Kap. 2.2.13.1 beschrieben. DNA wurde extrahiert und RNA wurde mit RNaseA degradiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung von unbehandelter (-) und behandelter (+) DNA zeigt eine Fragmentierung von ~0,5 kb.

Für einige plastidäre Gene konnte bereits gezeigt werden, dass die PEP-DNA Bindung lichtabhängig ist (Yagi *et al.* 2012). Dementsprechend wurden auch in dieser Arbeit verschiedene Lichtbedingungen für die Koimmunopräzipitation gewählt. Neben dem oben beschriebenen Lichtexperiment wurden die Pflanzen sechs Tage unter Standardbedingungen angezogen und vor der Isolation der Chloroplasten für 16 Stunden vollständiger Dunkelheit ausgesetzt. Das Alter der Pflanzen und der Erntezeitpunkt entsprachen den für das Lichtexperiment verwendeten Bedingungen. Während der Ernte und Präparation der dunkeladaptierten Pflanzen wurde ausschließlich Grünlicht (Wellenlänge 525 nm) verwendet. Es ist wahrscheinlich, dass das grüne Spektrum des Sonnenlichts nicht mit den normalen Lichteffekten einhergeht, sondern ihnen entgegengesetzt wirkt (Folta und Maruhnich 2007). Das bedeutet, dass Grünlicht kaum eine Veränderung zwischen Dunkel und Licht hervorruft. Die experimentelle Prozedur blieb die gleiche. Anschließende Western Analysen mit dem HA-spezifischen Antikörper belegten, dass der präzipitierte Anteil von RpoA, unabhängig von den verwendeten Lichtbedingungen, gleich bleibt (Abb. 14, rechte Seite).

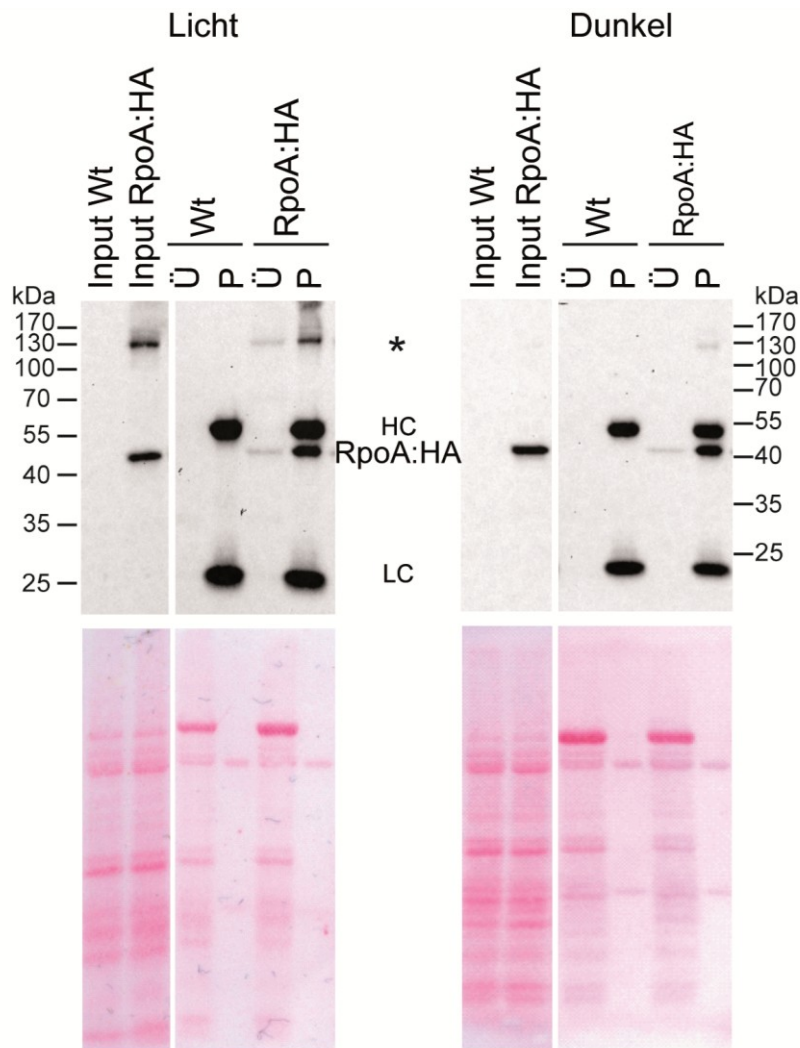


Abb. 14: Immunopräzipitation von HA-markierten RpoA während der Licht- und Dunkelperiode. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte aus Pflanzen, die unter Standardbedingungen oder unter Dunkelbedingungen angezogen wurden. RpoA:HA wurde aus solubilisierten Membranextrakten und nach Ultraschall Behandlung mit dem HA-AK präzipitiert. Für die Western Analyse wurden 1/10 Volumen des Inputs, 1/25 Volumen des Überstands und 1/10 Volumen der Pelletfraktionen aus WT und transplastomischen Pflanzen untersucht. Sternchen markieren Kreuzhybridisierungen des Antikörpers. Ponceau S Färbung der gleichen Membranen dient als Beladungskontrolle (unten). P = Pellet, Ü = Überstand, HC, LC = *heavy chain* (schwere Kette) und *light chain* (leichte Kette) des Antikörpers.

3.1.9 Identifikation von PEP assoziierten DNA Regionen mittels ChIP-on-Chip

Bisher existieren keine das gesamte Chloroplastengenom erfassende Analysen zur DNA Assoziation der RNA Polymerase. Derzeitige Chromatin Immunopräzipitationen (ChIP) umfassen nur einige wenige ausgewählte Gene, die mit der PEP und/ oder PEP-assozierten Proteinen interagieren (Hanaoka *et al.* 2012, Yagi *et al.* 2012, Noordally *et al.* 2013, Zhong *et al.* 2013). Um PEP- bzw. RpoA- assoziierte DNA Regionen auf plastomweiter Ebene *in vivo* zu identifizieren, wurden RpoA:HA Immunopräzipitationen aus solubilisierten Membranfraktionen transplastomischer und WT Tabakpflanzen ausgeführt (s. Kap. 3.1.8). Die DNA aus Präzipitat und Überstand jeder IP wurde isoliert und mit RNaseA versetzt zur Entfernung von RNA Kontaminationen. Anschließend wurden die präzipitierte und freie DNA differenziell mit Fluoreszenzfarbstoffen (jeweils mit Cy5 oder Cy3) markiert, kompetitiv auf ein Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Microarray* hybridisiert, detektiert und analysiert (Chromatin Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung, ChIP-on-Chip). Die *Microarrays* wurden so konstruiert, dass das gesamte Chloroplastengenom von Tabak durch ca. 300 überlappende PCR-Produkte mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 716 bp erfasst wird (Finster *et al.* 2013). Kontrollexperimente wurden mit dem spezifischen HA-Antikörper auf solubilierte Membranextrakte von WT Chloroplasten ausgeführt. Der Quotient von gebundener zu ungebundener DNA (Pellet/Überstand) wurde für HA-markierte RpoA Linien (RpoA:HA) und die Kontrolllinien (WT) kalkuliert und ins Verhältnis gesetzt. Diese differenzielle DNA Anreicherung in den IPs aus transplastomischen Pflanzen gegenüber denen aus WT Pflanzen (+HA/-HA) wurde gegen die Genomposition des *Microarrays* aufgetragen (Abb. 15).

3.1.9.1 PEP-assozierte DNA unter Lichtbedingungen

Plastomweit lassen die ChIP-on-Chip Analysen Regionen mit starker (Plateau) und solche mit schwacher (Tal) Anreicherung erkennen. Unter Lichtbedingungen waren besonders plastidäre Gene angereichert, die durch PEP Promotoren transkribiert werden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich, aber nicht ausschließlich um Photosynthesegene. Zu den am stärksten in den RpoA:HA Linien angereicherten DNA Regionen von allen Protein-kodierenden Genen gehören *psbA*, *psbC/D* (kodieren für Untereinheiten des Photosystem II Komplex), *psaA/B* (kodieren für Proteine des Photosystem I) und *rbcL* (kodiert für die große Untereinheit der

RuBisCo). Unter den 25 am stärksten angereicherten DNA Abschnitten befinden sich 12 PCR-Produkte für Photosynthesegene (siehe Tab. 1, Anhang 2). Neben diesen konnte auch eine starke Anreicherung für das *rnn* Operon gefunden werden, das für ribosomale RNAs kodiert. Außerdem zeigte RpoA:HA eine starke Assoziation mit einigen tRNAs, wie der *trnV-trnM* Region, *trnG*, *trnL*, *trnI* und *trnA* (siehe Abb. 15 und Tab. 1, Anhang 2). Gene, die hauptsächlich von NEP Promotoren kontrolliert werden, wie das *rpoB* Operon, *clpP* (Untereinheit der Clp Protease), das große Operon der ribosomalen Proteine und auch *accD* (Untereinheit der Carboxytransferase der Acetyl-CoA Carboxylase), waren in den ChIP-on-Chip Analysen nicht angereichert. Dementsprechend zeigt die PEP bzw. RpoA im Licht eine eindeutige Präferenz für Gene der Photosynthese, rRNA Gene und einige tRNA Gene.

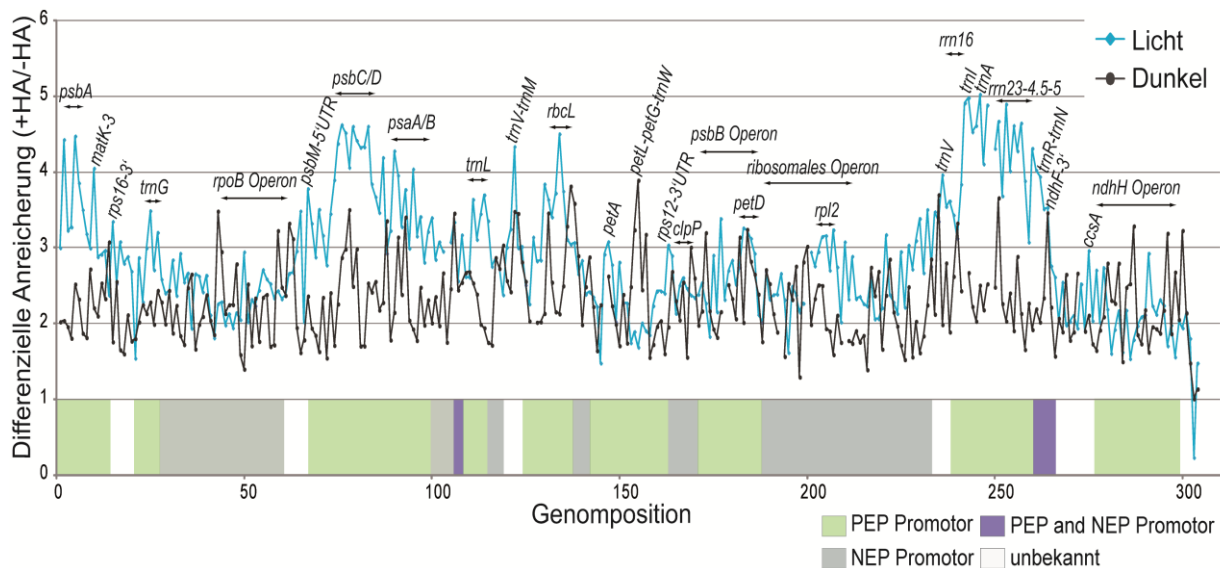


Abb. 15: Identifikation von RpoA:HA-assoziierten DNA Sequenzen für Licht- und Dunkelexperimente. RpoA:HA-assoziierte DNA wurde durch epitopbasierte DNA Koimmunopräzipitation und *Microarray* Analyse identifiziert (ChIP-on-Chip). Die Anreicherungswerte von Präzipitat gegenüber Überstand ($F635/F532 = \text{Pellet}/\text{Überstand}$) einer RpoA:HA IP (+HA) wurden durch die Anreicherungswerte der zugehörigen WT IP (-HA) dividiert (+HA/-HA) und gegen die Genomposition aufgetragen. Die differenzielle Anreicherung +HA/-HA der Lichtbedingungen wurde zwischen zwei IP-Experimenten mit RpoA:HA und zwei Kontrollexperimenten mit WT kalkuliert (blaue Kurve). Die differenzielle Anreicherung unter Dunkelbedingungen wurde aus zwei IP-Experimenten mit RpoA:HA und einem Kontrollexperiment mit WT berechnet (schwarze Kurve). Um beide Wachstumsbedingungen miteinander zu vergleichen, wurden die differenziellen Anreicherungen von Licht und Dunkel gegen die Gesamtheit aller Anreicherungswerte der Sonden des *rpoB* Operons (kein PEP Transkript) normalisiert. Die Wertetabelle mit den Rohdaten ist bei Finster *et al.* (2013) gezeigt.

Einige in früheren Studien identifizierte Ziele der PEP zeigten unter den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen keine Anreicherung. Zu dieser Gruppe von Genen zählt z.B. das *psbB* Operon. Genetische Studien zeigten, dass *psbB* in erster Linie durch die PEP transkribiert wird (Hajdukiewicz *et al.* 1997b, Legen *et al.* 2002). Allerdings ist *psbB* in den hier erhobenen *Microarray* Daten nicht stärker angereichert als bekannte NEP-abhängige Gene wie *clpP* und *accD*. Zusammenfassend ist die PEP mit multiplen DNA Regionen im Licht assoziiert. Dabei werden PEP-abhängig transkribierte Gene mit wenigen Ausnahmen bevorzugt.

3.1.9.2 Selektive Reduktion der DNA Assoziation von PEP im Dunkeln

Es stellt sich die Frage, ob die oben gezeigte DNA Assoziation lichtreguliert ist. Um dies zu beantworten, wurden ChIP-on-Chip Versuche mit dunkeladaptierten Pflanzen vorgenommen (Wachstumsbedingungen siehe Kap. 3.1.8). Wie schon in Kap 3.1.9 beschrieben, wurden Immunopräzipitationen mit solubilisierten Membranfraktionen von Chloroplasten der RpoA:HA Linie und WT als Kontrolle durchgeführt. Die Effizienz beider IPs war in Licht- und Dunkelexperimenten gleich (siehe Kap. 3.1.8). Um die ChIP-on-Chip Experimente von lichtgewachsenen und dunkeladaptierten Pflanzen zu vergleichen, wurde die differenzielle Anreicherung von zwei Dunkel- und zwei Lichtexperimenten basierend auf der Summe aller Signale der *rpoB* PCR-Produkte, die das gesamte *rpoB* Operon auf dem *Microarray* repräsentieren (20 PCR-Produkte), normalisiert. Das *rpoB* Operon war am besten für die Normalisierung geeignet, da dieses Operon ausschließlich durch NEP transkribiert wird (Legen *et al.* 2002, Zhelyazkova *et al.* 2012) und bereits durch Yagi *et al.* (2013) gezeigt wurde, dass es in ChIP Experimenten nicht mit der PEP assoziiert ist.

Dieser Vergleich der beiden Wachstumsbedingungen zeigte eine lichtabhängige Assoziation der PEP mit einigen Regionen des plastidären Chromosoms (Abb. 15 und Tab.1, Anhang 2). Die differenzielle Anreicherung des Lichtexperiments verglichen zu dem Dunkelexperiment ist am stärksten für die Regionen ausgeprägt, die das *psbC/D* Operon, das *rrn* Operon, *psbA*, das *psaA/B* Operon und *rbcl* umfassen. Bei den tRNA Genen zeigen vor allem die Intronhaltigen tRNAs *trnI*(GAU) und *trnA*(UGC) eine lichtabhängige Anreicherung mit dem RpoA:HA Präzipitaten. Beide tRNAs sind Teil des *rrn* Operons. Auch die *trnD/Y/E* Region, welche ein

Vorläufertranskript mit allen drei tRNAs hervorbringt (Tsunoyama *et al.* 2004), zeigte eine starke Assoziation mit der PEP unter den Lichtbedingungen.

Insgesamt zeigten 227 der 302 PCR-Sonden des *Microarrays* eine stärkere differenzielle Anreicherung im Licht als im Dunkeln, was 75% des gesamten Plastoms entspricht (Abb. 15 und 16). Unter den stärksten angereicherten Regionen finden sich Gene, für die eine Lichtregulation bekannt ist, z.B. *psbA* und *psbC/D* (Gamble und Mullet 1989, Greenberg *et al.* 1989, Christopher und Mullet 1994). Von den 75 PCR-Sonden, die eine stärkere Anreicherung unter Dunkelbedingungen im Vergleich zu Lichtbedingungen aufwiesen, war nur die *petL-petG-trnW/P* Region am stärksten (zweifach) im Dunkeln angereichert (siehe Abb. 16). Weitere, weniger starke Anreicherungen unter Dunkelbedingungen konnten für die Gene des *ndh* Operons gefunden werden, welches für Untereinheiten des NADH-Dehydrogenasekomplexes kodiert (siehe Tabelle 1, Anhang 2, 3 PCR-Produkte befinden sich unter den ersten 25 Treffern). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass nur wenige Gene mit der PEP bevorzugt im Dunkeln assoziieren.

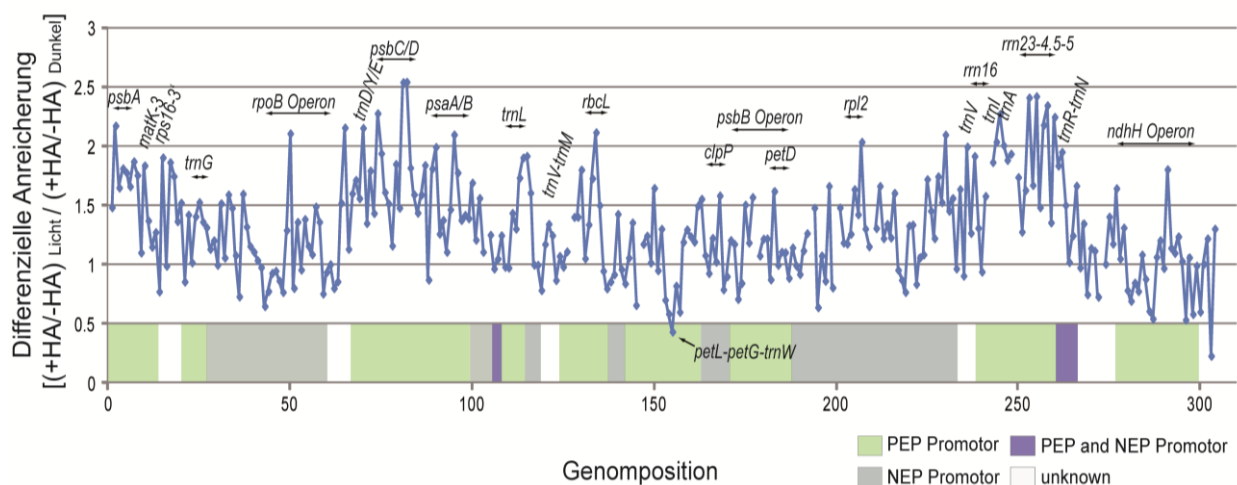


Abb. 16: Identifikation von DNA Fragmenten, die mit dem epitopmarkierten RpoA aus Chloroplastenmembranen assoziiert sind, mittels ChIP-on-Chip Analyse. Die Anreicherungswerte der kopräzipitierten DNA aus den IPs der Lichtbedingungen aus Abb. 15 wurden mit den Werten der IPs aus Dunkelexperimenten aus Abb. 15 ins Verhältnis gesetzt $[(+HA/-HA)_{\text{Licht}} / (+HA/-HA)_{\text{Dunkel}}]$ und gegen die Genomposition aufgetragen.

Zur Bestätigung der ChIP-on-Chip Experimente wurde alternativ mit der Dot blot DNA Hybridisierung, die koimmunopräzipitierte DNA für einige ausgewählte Gene untersucht. Dabei wurde die DNA aus den jeweiligen IP-Fractionen (Überstand und

Pellet) extrahiert und auf Nylonmembranen transferiert. Anschließend erfolgte eine Hybridisierung mit genspezifischen radioaktiv markierten PCR-Sonden, die in den *Microarray* Experimenten eine starke bzw. keine oder geringe Anreicherung zeigten (siehe Abb.17 A). Die Signale wurden quantifiziert und die Ratio von Pellet- und Überstandsignalen aus den epitopmarkierten Linien RpoA:HA und den WT Kontrollen ins Verhältnis gesetzt ((+HA/-HA), siehe Abb. 17 B). Für *rbcL*, *rrn23*, *rrn16*, *psbD* und *psbA* konnte eine spezifische Anreicherung in den RpoA:HA Präzipitaten unter Lichtbedingungen verzeichnet werden. Diese Gene zeigten bereits in den ChIP-on-Chip Hybridisierungen eine deutliche Bindung der PEP unter Lichteinfluss. Dem gegenüber stehen die Dunkelbedingungen bei denen eine Reduktion um fast die Hälfte im Vergleich zur Anreicherung im Licht zu beobachten war. Gene, die keine bzw. eine schwache Anreicherung in den *Microarray* Analysen zeigten, wurden als Kontrollen verwendet, z.B. die PCR-Sonden *rpoC2* und *ndhF*. Diese Analyse bestätigt die oben gezeigten ChIP-on-Chip Ergebnisse und zeigt deutlich, dass die DNA Assoziation der PEP mit ihren Genen lichtabhängig ist.

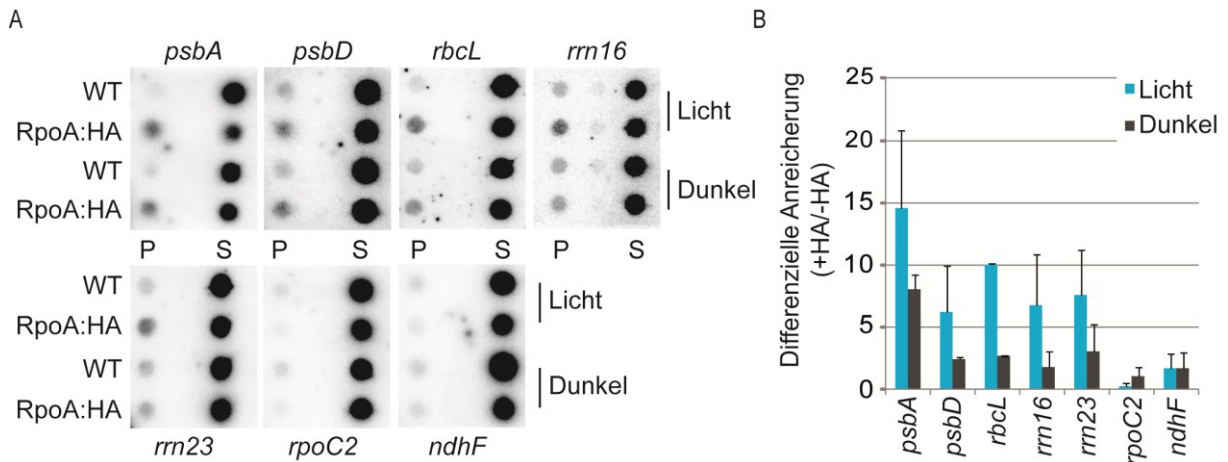


Abb. 17: Dot blot Hybridisierungen kopräzipitierter DNA mit PCR-Sonden zur Bestätigung der ChIP-on-Chip Analysen für Licht- und Dunkelexperimente. (A) DNA aus Pellet- und Überstandfraktionen einer IP mit dem HA-Antikörper wurden isoliert, auf einer Nylonmembran fixiert und mit radioaktiv markierten PCR-Sonden hybridisiert. Die verwendete Sonde ist über bzw. unter jedem Blot eingezeichnet. Die PCR-Sonden waren identisch zu den im *Microarray* verwendeten Sonden und die zugehörigen Primer sind in Tab. 6 (Anhang 2) zu finden. Die IPs von RpoA:HA Linien und WT wurden parallel untersucht. (B) Quantifizierung der Dotblots mittels Phosphorimager und Quantity-One Software (Bio-Rad). Die Ratio von Pellet- und Überstandsignalen wurden berechnet und zwischen RpoA:HA Linien und WT ins Verhältnis (+HA/-HA) gesetzt und für je zwei Experimente zusammengefasst. Vertikale Linien zeigen die Standardabweichung.

Der PEP Komplex ist mit den Membranen verankert, was in reifen Chloroplasten, nicht aber in jungen Chloroplasten, sehr wahrscheinlich über die plastidäre DNA vermittelt wird (siehe Kap.3.1.6). Um die Beziehung zwischen der Chloroplastenentwicklung und der Assoziation der PEP mit cpDNA in adulten Chloroplasten zu untersuchen wurden vergleichbare Dotblot DNA Hybridisierungen mit 60 Tage alten Pflanzen ausgeführt. Diese weisen darauf hin, dass sich die DNA Assoziation der PEP zu ausgewählten Genen nicht entwicklungsabhängig verändert (s. Abb. 31, Anhang 1).

3.1.10 Identifikation RpoA:HA-assoziierter RNAs mittels RIP-Chip

Die in dieser Arbeit bisher gezeigten Studien befassten sich mit der DNA Assoziation der PEP. Sie konnten belegen, dass die PEP mit bestimmten DNA Regionen interagiert. Frühere Analysen des plastidären Transkriptoms in PEP-defizienten Tabakpflanzen, ribosomdefizienten Pflanzen oder die Untersuchung des Transkriptoms unter Anwesenheit eines PEP Inhibitors konnten Gene entschlüsseln, die durch die PEP transkribiert werden (Legen et al. 2002, Demarsy et al. 2012, Zhelyazkova et al. 2012), aber bislang fehlen Daten über die tatsächliche Aktivität der Polymerase an den einzeln betrachteten Genen. Um die Aktivität der PEP *in vivo* an spezifischen Genen unter verschiedenen Lichtbedingungen auf plastomweiter Ebene zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit RNA Koimmunopräzipitationen und *Microarray* Analysen (RIP-Chip) von RpoA:HA durchgeführt. Ziel war es naszierende RNAs mit der PEP aufzureinigen. Für die Immunopräzipitation von RpoA:HA wurden mit Formaldehyd behandelte und mit NP-40 solubilierte Gesamtchloroplastenextrakte sieben Tage alter Pflanzen verwendet, die unter den oben beschriebenen Lichtbedingungen herangezogen wurden. Die Verwendung von Gesamtchloroplastenextrakten anstelle der zeitaufwändigen Präparation von Chloroplastenmembranen sowie die Verwendung eines speziellen Polysomenisolationspuffers ermöglichten einen schnellen Ablauf der Prozedur und hielten die Degradation plastidärer RNAs so gering wie möglich (siehe auch Material und Methoden Kap. 2.2.11). Diese Veränderungen wurden ausgeführt, da bereits kurz nach Aufschluss der Chloroplasten mit dem Extraktionspuffer für ChIP-on-Chip Analysen ein schneller Abbau plastidärer RNA einsetzt (persönliche Mitteilung Dr. Julia Legen). Das erschwert vermutlich die Isolation und damit auch die Analyse

PEP-naszierender RNAs über die herkömmliche Methode, da sie nur eine kleine Subpopulation repräsentieren.

Die Immunopräzipitation wurde mittels Western Analysen überprüft (s. Abb. 18) und zeigte, dass RpoA:HA im Gesamtchloroplastenextrakt (Input) vorhanden war und sich HA-markiertes RpoA präzipitieren lässt. Ein kleiner Teil blieb in der Überstandfraktion. Es konnte kein Unterschied zwischen Licht- und Dunkelexperiment in dem Anteil des präzipitierten RpoA Proteins detektiert werden. Zur Aufhebung des initialen *Crosslinks* wurden die IP-Fraktionen mit Proteinase K und anschließend mit Hitze behandelt. Nach der Proteinase K Behandlung war RpoA:HA in der Pelletfraktionen nicht mehr nachweisbar, was für eine vollständige Degradation des Proteins spricht (Abb. 18, Spuren rechts).

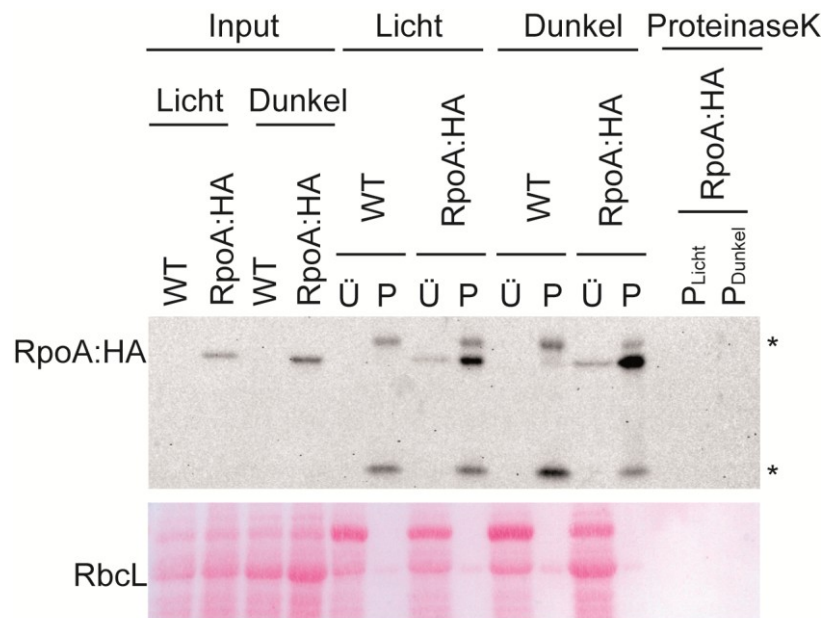


Abb. 18: Immunopräzipitation von HA-markierten RpoA aus Gesamtchloroplastenextrakten während der Licht- und Dunkelperiode. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte aus Pflanzen, die unter Standardbedingungen oder unter Dunkelbedingungen angezogen wurden (s. Kap. 2.2.13.1 und Wachstumsbedingungen Kap. 3.1.8). RpoA:HA wurde aus solubilisierten Gesamtchloroplastenextrakten mit dem HA-AK präzipitiert. Für die Western Analyse wurden 1/10 Volumen des Inputs, 1/25 Volumen des Überstands und 1/10 Volumen der Pelletfraktionen aus WT und transplastomischen Pflanzen untersucht. 1/10 Volumen der Pelletfraktionen des Licht- und Dunkelexperiments nach dem Proteinase K Verdau wurden zur Kontrolle des Proteinase K Verdaus aufgetragen. Sternchen markieren die HC und LC des Antikörpers. Ponceau S Färbung der gleichen Membran als Beladungskontrolle (unten). P = Pellet, Ü = Überstand, HC, LC = *heavy chain* (schwere Kette) und *light chain* (leichte Kette) des Antikörpers, RbcL = große Untereinheit der RuBisCo.

Die kopräzipitierte und freie RNA aus den Licht- und Dunklexperimenten wurde isoliert, mit DNaseI behandelt, differenziell mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 (für Pellet-RNA) bzw. Cy3 (für Überstand-RNA) markiert und kompetitiv auf dem Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Microarray* hybridisiert, detektiert und analysiert wie in Kap. 3.1.9 beschrieben (RNA Immunopräzipitation und Chip-Hybridisierung, RIP-Chip). Kontrollexperimente mit Gesamtchloroplastenextrakten von WT Pflanzen wurden parallel untersucht. Der Quotient aus Pellet- und Überstandsignal wurde für die HA-markierten RpoA Linien und WT Kontrolllinien berechnet und ins Verhältnis gesetzt. Die differenzielle Anreicherung von markierten zu nicht markierten RpoA (+HA/-HA) aus dem Lichtexperiment wurde gegen die Genomposition des *Microarrays* aufgetragen (s. Abb.19). Um RpoA:HA-assoziierte RNA der lichtgewachsenen Pflanzen mit den dunkeladaptierten Pflanzen zu vergleichen, wurde wie in Kap. 3.1.9.2 beschrieben eine Normalisierung basierend auf der Summe der Signale aller *rpoB* PCR-Sonden durchgeführt.

Die RIP-Chip Analysen zeigten eine starke Anreicherung für besonders abundante plastidäre RNAs, wie *psbA*, *rbcL* und das *rrn* Operon mit *rrn16*, *rrn23* sowie *rrn4,5* und *rrn5*. Interessanterweise konnte eine starke und signifikante Anreicherung für viele tRNAs detektiert werden. So befinden sich unter den ersten 25 Treffern der RIP-Chip Analyse für das Lichtexperiment fast ausschließlich tRNAs, z.B. *trnA(UGC)*, *trnI(GAU)*, *trnL*, *trnV-trnM*, *trnG(UCC)*, *trnV(GAC)* und *trnD/Y/E* (21 Treffer, siehe Tab. 2, Anhang 2). Für einige intronhaltige tRNAs (*trnL*, *trnV*, *trnI* und *trnA*) konnte sogar eine Anreicherung für reine Intronsonden detektiert werden (siehe Detailansicht Abb.20). Diese Sonden beinhalten nur die Sequenz des Introns der jeweiligen tRNA und sind rot hervorgehoben. Das spricht für die Assoziation der PEP zu unprozessierten und möglicherweise naszierenden Transkripten. Handelt es sich um reife tRNAs, die mit der PEP interagieren würden, dann könnten in den RIP-Chip Analysen keine Signale für diese Introns detektiert werden.

Ergebnisse

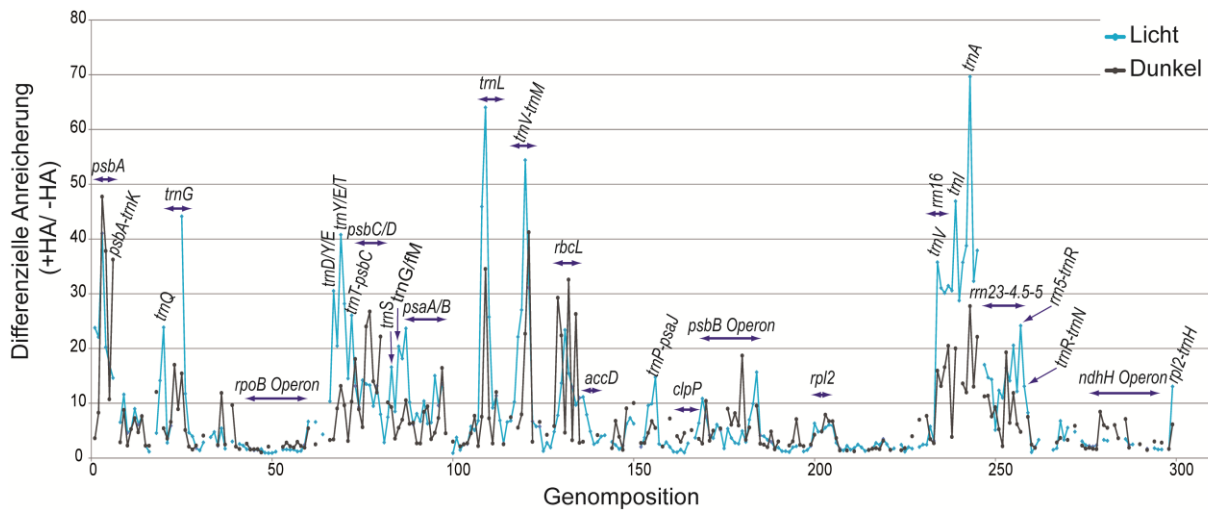


Abb. 19: Identifikation RpoA:HA assoziierter RNAs in Gesamtchloroplastenextrakten transplastomischer Pflanzen unter Licht- und Dunkelbedingungen. RpoA:HA-assoziierte RNA wurde durch HA-basierte RNA Koimmunopräzipitation und *Microarray* Analyse bestimmt (RIP-Chip). Die Anreicherungswerte von Pellet gegenüber Überstand (F635/F532 = Pellet/ Überstand) der RpoA:HA IP (+HA) wurde durch die Anreicherungswerte (F635/F532 = Pellet/ Überstand) der zugehörigen WT IP (-HA) dividiert (+HA/-HA) und dann gegen ihre Genomposition des *Microarrays* aufgetragen. Die differenzielle Anreicherung im Licht wurde zwischen zwei Experimenten von RpoA:HA und zwei Kontrollexperimenten mit WT kalkuliert (blaue Kurve). Die differenzielle Anreicherung im Dunkeln wurde zwischen zwei RpoA:HA Experimenten und zwei Kontrollexperimenten mit WT ermittelt (schwarze Kurve). Um einen Vergleich zwischen Licht und Dunkel zu ermöglichen, wurden alle Signale gegen die Gesamtheit aller Signale der Sonden des *rpoB* Operons normalisiert. Die Wertetabellen befinden sich in Tab. 7 und Tab. 8, Anhang 2.

RNAs, die für Proteine des Photosynthesekomplexes kodieren und hauptsächlich durch die PEP transkribiert werden wie *psbC/D* und *psaA/B* oder das *psbB* Operon zeigten eine weniger starke Anreicherung verglichen mit *psbA* (7. Treffer, s. Tab. 2, Anhang 2) und den tRNAs. Eine weitere unerwartete Entdeckung war, dass die PEP im Dunkeln mit vielen RNAs assoziiert blieb. Die RNA Assoziation unter Licht- und Dunkelbedingungen verhalten sich nahezu gleich. Dies gilt besonders für *psbA*, *rbcL*, *trnL*, *trnV-trnM* und *rm23*. Die Assoziation zu einigen tRNAs, wie *trnL*, *trnV-trnM* blieb in der Dunkelheit erhalten, wohingegen für die tRNAs *trnD/Y/E* und *trnI* sowie *trnA* die Anreicherung weniger stark ausgeprägt war. Auch im Dunkeln waren immerhin zehn tRNAs unter den ersten Treffern des RIP-Chips (s. Tab. 2, Anhang 2).

Wie auch in den ChIP-on-Chip Analysen konnte keine Anreicherung für RNAs detektiert werden, die unter der Kontrolle der kernkodierten RNA Polymerase NEP stehen (z.B. das *rpoB* Operon sowie *clpP* und *accD* RNAs). Zusammenfassend lässt

sich festhalten, dass die PEP bzw. RpoA im Licht sowie im Dunkeln hauptsächlich mit tRNAs assoziiert ist. Im Gegensatz zu den ChIP-on-Chip Analysen, bei denen eine selektive Reduktion der DNA Assoziation der PEP im Dunkeln zu verzeichnen war, ist die RNA Assoziation der PEP lediglich für einige Transkripte vermindert, für andere dagegen gleichbleibend bzw. erhöht (siehe bspw. *psbA* und *rbcL*, Vergleich zwischen Licht- und Dunkelexperiment in Abb. 19). Eine Bestätigung dieses Ergebnisses mittels Dotblot Analysen steht noch aus.

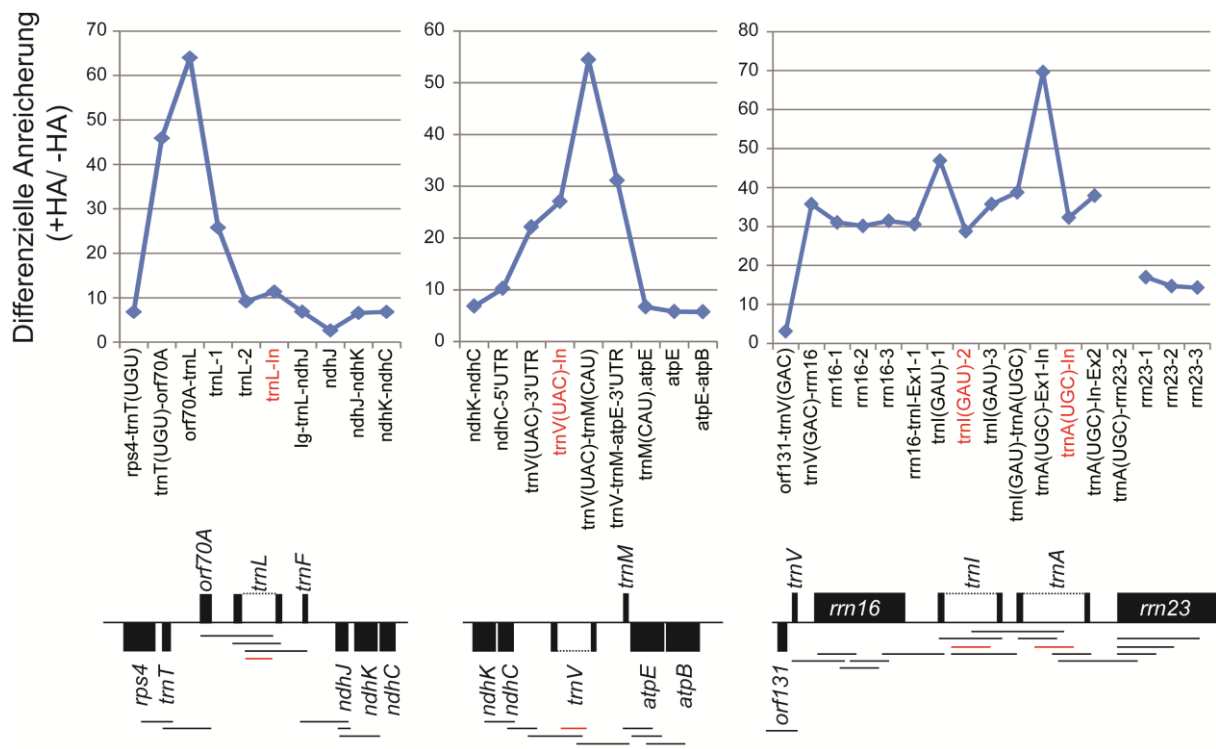


Abb. 20: Detailansicht RpoA:HA-assoziierter RNA unter Lichtbedingungen für die Regionen *trnL*, *trnV*, *trnI* und *trnA*. Oben: Die differenzielle Anreicherung des Lichtexperiments wurde gegen die Genomposition aufgetragen. Die Anreicherungswerte stammen aus Abb. 19 und sind in den Tabellen 7 und 8 (Anhang 2) zusammengefasst. Das Signal für die Intronsonde wurde rot hervorgehoben. Unten: Schematische Darstellung der Genkarte für die *trnL*- und *trnV*-Region sowie der *trnI*-/ *trnA*-Region. Exons sind durch schwarze Rechtecke und Introns durch dünne gestrichelte Linien, die die Exons verbinden, gezeigt. Dünne Linien unterhalb der Genkarte markieren die PCR-Sonden, die für die *Microarrays* verwendet wurden. Rote Linien repräsentieren PCR-Sonden, die nur die Sequenz des Introns der jeweiligen tRNA enthalten.

3.1.11 Epitopmarkierung von *rpoC2* und *rps2*

Zur Verifizierung der bisher beschriebenen Ergebnisse wurde eine zweite Kernuntereinheit der PEP mit dem Streptavidin-Epitop (Strep-Epitop) markiert. Zusätzlich wurde ein ribosomales Protein mit dem HA-Epitop versehen. Die Kombination aus beiden Markierungen der Transkriptions- und Translationsmaschinerie in einem Gewebe sollte eine gleichzeitige Identifikation von eventuell überlappenden Sets von RNAs erlauben, die mit der PEP und den Ribosomen assoziiert sind. Außerdem können diese neuen Werkzeuge Einblicke in die Lokalisation der gesamten Genexpressionsmaschinerie der Chloroplasten durch z.B. Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen.

Zusammen mit der Masterstudentin Denise Czepluch wurden die beiden Gene *rpoC2* und *rps2* stabil mit der Plastidentransformation mit dem jeweiligen Epitop markiert. Dabei wurde das Gen *rps2* mit dem HA-Epitop am N-Terminus und das Gen *rpoC2* mit dem Strep-Epitop am C-Terminus versehen. Ein Kontrollkonstrukt, welches nur den Resistenzmarker *aadA* enthielt, wurde parallel hergestellt. Das Design der Transformationsvektoren ist in Abb. 21 dargestellt. Die stabile Transformation erfolgte wie in Kap. 3.1.1 beschrieben.

Die primären Transformanten wurden für weitere Rekombinationsrunden auf selektivem Spectinomycin-haltigem Medium ausgesetzt, um die WT Plastomkopien zu eliminieren. Die Integration der *aadA* Kasette und die der beiden *Tags* (HA- und Strep-*Tag*) wurde mittels PCR und Southern Analysen untersucht (Daten nicht gezeigt, Masterarbeit von Denise Czepluch). Vier unabhängige transplastomische Linien enthielten das *rpoC2:Strep-HA:rps2* Konstrukt. Allerdings konnten bisher unter allen untersuchten Linien keine homoplastomischen Pflanzen identifiziert werden.

Keimungstests auf selektivem Medium bestätigten die Heteroplastomie der *aadA*-Kasette in den Keimlingen der F1 Generation. Es konnten unter ~1000 Keimlingen nur sehr wenige grüne und somit Spectinomycin-resistente Pflanzen identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

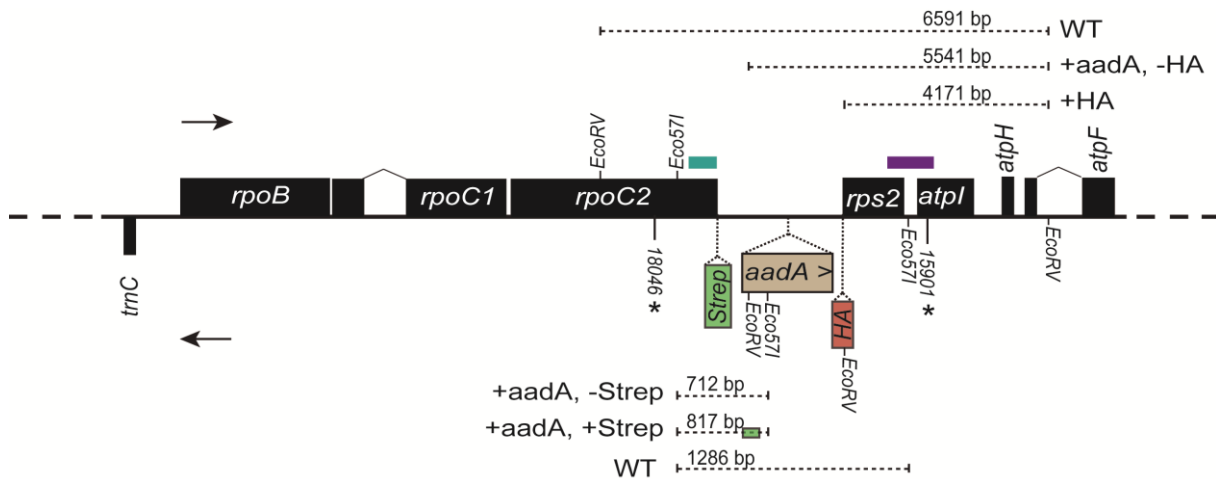


Abb. 21: Genkarte der *rpoC2-rps2*-Region von *Nicotiana tabacum* und Integration einer HA-Epitopsequenz N-terminal von *rps2*, einer Strep-Epitopsequenz C-terminal von *rpoC2* sowie eines Resistenzmarkers zwischen *rpoC2* und *rps2*. Exons werden als schwarze und die Insertionen (*aadA*, HA und Strep) als farbige Rechtecke gezeigt. Nichtkodierende Bereiche sind durch schwarze Linien und Introns durch dünne Linien, die die Exons verbinden, repräsentiert. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. Die Sternchen markieren die Grenzen des Plastomfragments im Transformationsvektor. Die Zahlen entsprechen den Positionen im Tabakplastom (Akzession NCBI: NC_001879.2). *aadA* = Resistenzmarker (> = Transkriptionsrichtung), HA = Hämagglutinin Epitop, Strep = Streptavidin Epitop. *EcoRV*, *Eco57I* = erforderliche Schnittstellen für Southern Analysen. Die blaue dicke Linie oberhalb von *rpoC2* und die violette dicke Linie oberhalb von *rps2* kennzeichnen die Position der Sonden für die Southern Analysen. Gestrichelte Linien deuten Restriktionsfragmente mit ihren erwarteten Größen nach der Restriktion (oben: *EcoRV* für den Nachweis des HA-Tags, unten: *Eco57I* für den Nachweis des Strep-Tags) in Southern Analysen an.

Die transplastomischen Pflanzen der Kalluslinien zeigten nach Umsetzung auf Erde einen Phänotyp bei dem ganze Blattsegmente eine gestörte bzw. fehlende Entwicklung aufwiesen (siehe Abb. 22). Das deutet auf eine eingeschränkte Zellentwicklung durch die Beeinträchtigung der plastidären Genexpression in diesen transgenen Pflanzen hin. Nach einigen Wochen bildeten die Pflanzen jedoch einen normalen Phänotyp aus, der sich vom Wildtyp nicht unterscheiden ließ (Daten nicht gezeigt). Ob beide epitopmarkierten Proteine in den transgenen Pflanzen exprimiert werden, muss noch überprüft werden.

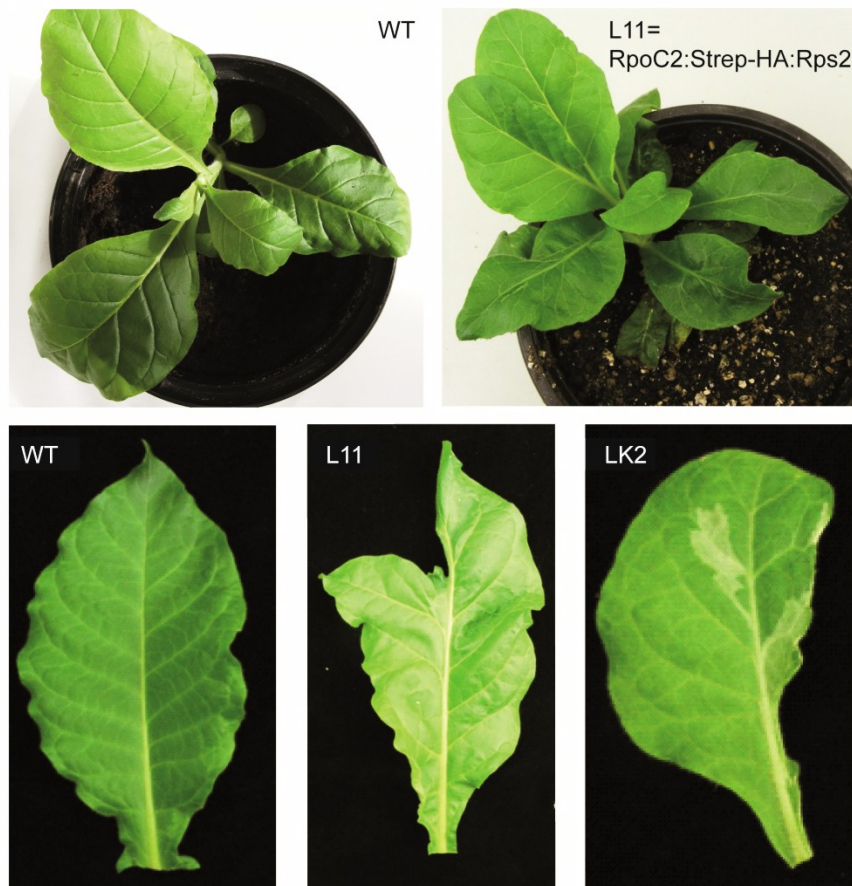


Abb. 22: Phänotyp der mit HA-markierten Rps2 und Strep-markierten RpoC2 Tabakpflanze und WT. Auf der Erde gewachsene, heteroplastomische transgene Pflanzen unterscheiden sich phänotypisch durch eine gestörte bzw. fehlende Blattentwicklung vom WT. Oben: Phänotyp des Wildtyps (WT) und einer Pflanze der Linie L11 (RpoC2:Strep-HA:Rps2). Unten: Das dritte Blatt von WT, L11 und der Kontrolllinie LK2 ist einzeln dargestellt, zur Visualisierung der zerstörten Blattbereiche in den transgenen Pflanzen.

3.2 Charakterisierung Nukleoid-assoziiierter RNAs

Das sogenannte transkriptionsaktive Chromosom („*transcriptionally active chromosome*“ oder kurz TAC), ist ein chloroplastidärer Multienzymkomplex, der in Form von großen DNA-Protein-Komplexen isoliert werden kann (Gao *et al.* 2011). Der TAC-Komplex wurde bereits aus verschiedenen Pflanzenarten aufgereinigt (Briat *et al.* 1979, Greenberg *et al.* 1984, Little und Hallick 1988, Suck *et al.* 1996, Pfalz *et al.* 2006) und seine spezifische Aktivität ist abhängig von der jeweiligen Aufreinigungsmethode (Suck *et al.* 1996, Krause und Krupinska 2000). Um die plastidäre Transkriptionsaktivität anzureichern, werden Nukleioide von den Thylakoidmembranen gelöst und die TACs durch Gelfiltrationen isoliert. Diese enthalten unter anderem die Kernuntereinheiten der PEP (RpoA, RpoB, RpoC1 und RpoC2) und weitere DNA- und RNA-bindende Proteine (Pfalz *et al.* 2006, Krupinska *et al.* 2013). So konnten in TAC-Präparationen bereits Mitglieder der PPR-Proteinfamilie sowie zwei Mitglieder der cpRNP Familie (CP29B und CP31A) identifiziert werden (Pfalz *et al.* 2006, Melonek *et al.* 2012). Beide Proteinfamilien sind an der organellären RNA Prozessierung und Translation beteiligt (Schmitz-Linneweber und Small 2008, Ruwe *et al.* 2011). Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass posttranskriptionale Prozesse in engem räumlichen Kontakt mit den Nukleoiden bzw. den TACs und damit auch mit der PEP stehen. In bisherigen Publikationen stand meist die Analyse TAC-assoziiierter Proteine im Fokus. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dagegen die Identifikation TAC-assoziiierter RNAs in Tabak. Dabei wurde zum einen die Verteilung plastidärer RNAs als auch ihr Prozessierungsstatus qualitativ untersucht.

Das Material für diese Analysen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Karin Krupinska in Kiel zur Verfügung gestellt. Es wurden zwei verschiedenen reine Fraktionen des TAC-Komplexes verwendet: TACI besteht aus den DNA-haltigen Fraktionen (exemplarisch ist die gelelektrophoretische Untersuchung der einzelnen Fraktionen in Abb. 23 A gezeigt), die nach der Gelfiltration eines Chloroplastenmembranextraktes aus Tabak gewonnen und vereinigt wurden. In diesen Fraktionen befinden sich neben der plastomischen DNA mehr als 100 verschiedene mit dem Transkriptionsapparat assoziierte Proteine. TACII wurde durch eine weitere Gelfiltration des TACI-Komplexes und anschließende Vereinigung der DNA-haltigen Fraktionen erhalten (gelelektrophoretische Untersuchung von TACII

exemplarisch in Abb. 23 B). TACII repräsentiert damit eine reinere Präparation des transkriptionsaktiven Chromosoms, welches nur noch ca. 50 verschiedene Proteine enthält (Melonek *et al.* 2012). Als Input Kontrolle (preTAC) wurde ein Aliquot des Chloroplastenmembranextraktes vor der Gelfiltration verwendet.

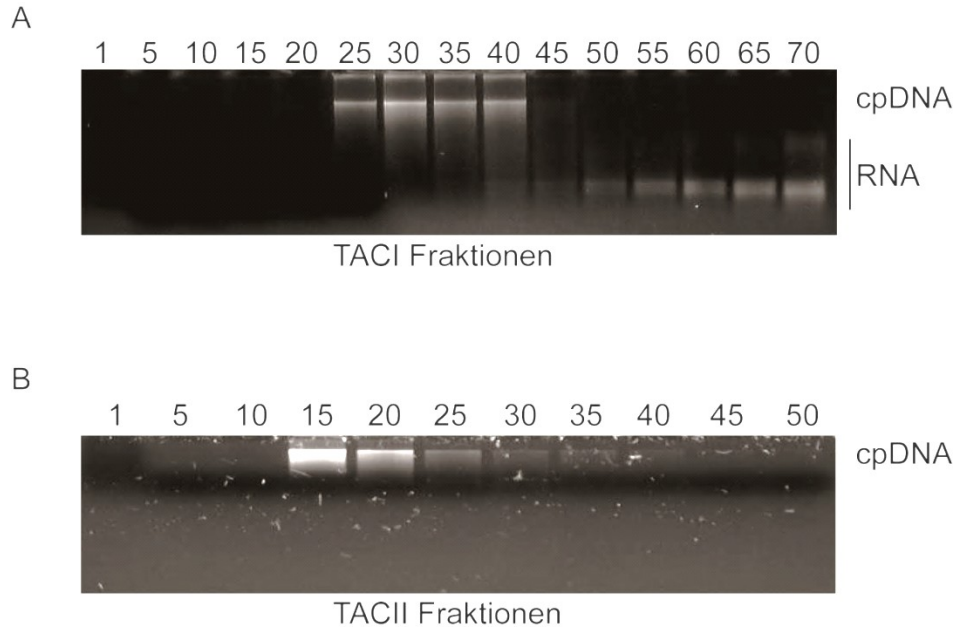


Abb. 23: Nachweis der plastidären DNA in den einzelnen TAC-Fractionen des TACI- und TACII-Komplexes mittels Gelelektrophorese. (A) Nach der ersten Gelfiltration wurde jede fünfte Fraktion der TACI-Präparation gelelektrophoretisch aufgetrennt. Fraktionen 25-40 wurden vereint und entsprechen TACI. (B) Nach einer zweiten Gelfiltration der TACI-Fractionen 25-40 wurde erneut jede fünfte Fraktion der TACII-Präparation gelelektrophoretisch analysiert. Fraktionen 15-20 entsprechen TACII. Die Agarosegelbilder wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karin Krupinska zur Verfügung gestellt. cpDNA = chloroplastidäre DNA.

3.2.1 Viele plastidäre mRNAs sind mit dem TAC-Komplex assoziiert

Um plastidäre Nukleoid-assoziierte RNAs auf plastomweiter Ebene zu identifizieren, wurden die beschriebenen TAC-Fractionen für *Microarray* Analysen verwendet. RNAs aus der preTAC-Fraktion und aus den TACI- sowie TACII-Fractionen wurden isoliert und mit DNaseI behandelt, um DNA Kontaminationen zu entfernen. Die RNA wurde anschließend differenziell mit Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert, kompetitiv auf einem Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Microarray* hybridisiert, detektiert und analysiert. Das Verhältnis von TACI-assoziiierter RNA und preTAC-RNA wurde aus drei biologischen und zwei technischen Replikaten ermittelt. Das Verhältnis von TACII-assoziiierter RNA und preTAC-RNA wurde aus drei biologischen

Replikaten gebildet. Für jedes Experiment wurde die Summe aller Signale der roten bzw. grünen Fluoreszenz bestimmt. Basierend auf dieser Summe eines willkürlich ausgewählten Experiments von TACI bzw. TACII wurden alle Signale jedes Experiments (rote Fluoreszenz) normalisiert. Genauso erfolgte die Normalisierung aller preTAC-Experimente (grüne Fluoreszenz). Anschließend wurde der Mittelwert zwischen den einzelnen Replikaten von TACI bzw. TACII und preTAC für jedes Signal berechnet. Nach Bestimmung der Mittelwerte wurde das Verhältnis von TACI zu preTAC oder TACII zu preTAC (roter zu grüner Fluoreszenz) ermittelt. Dieses Verhältnis wurde gegen die Genomposition des *Microarrays* aufgetragen (siehe Abb. 24, oben TACI und unten TACII).

Obwohl es sich bei TACII um einen höher aufgereinigten Komplex verglichen zu TACI handelt, wies die *Microarray* Analyse ein fast identisches Muster der TACI und TACII angereicherten RNAs auf (siehe Abb.24). Der Vergleich der ersten 25 am stärksten angereicherten RNAs aus TACI und TACII zeigte, dass zwölf Transkripte identisch zwischen TACI- und TACII-Fraktionen sind (siehe Tabelle 3, Anhang 2). Der *Microarray* Ansatz zeigte eine starke Anreicherung von nahezu allen plastidären RNAs, unabhängig von welcher RNA Polymerase sie transkribiert werden. Von den insgesamt 305 PCR-Sonden des *Microarrays* zeigten 246 (81%) für TACI und 259 (85%) für TACII einen Anreicherungswert der über zwei liegt (s. Abb. 24). Zu den am stärksten angereicherten mRNAs gehören unter anderem *matK*, *psaA/B*, *ndhA*, *ndhI*, *ndhG*, *ycf2*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2*. Diese mRNAs kodieren für Proteine unterschiedlicher Funktionsklassen. So zählt z.B. die *psaA/B* mRNA zu den mRNAs, die für Proteine des Photosynthesekomplexes PSI kodieren, *ndhA/I/G* kodieren für Untereinheiten des NADH-Dehydrogenasekomplex, *rpoB/C1/C2* kodieren für Untereinheiten der PEP, *matK* kodiert für den einzigen plastidären Spleißfaktor und *ycf2* verschlüsselt ein Protein mit bisher unbekannter Funktion. Das heißt, dass in den TAC-Fraktionen RNAs nahezu aller Funktionsklassen und auch PEP- bzw. NEP-regulierter Gene zu finden sind. Neben den oben beschriebenen Transkripten konnte auch eine Anreicherung für einige RNAs ribosomaler Proteine, wie *rps2*, *rps4*, *rpl20*, *rps8*, *rpl14* etc., gefunden werden (siehe Abb. 24, eingezeichnet als ribosomales Operon). Zusätzlich scheinen einige tRNAs, wie *trnK*, *trnI*, *trnA*, *trnS* und *trnG*, mit dem TAC assoziiert zu sein, wohingegen andere tRNAs, wie die polycistronische *trnD/Y/E* sowie *trnL* und *trnV*, nicht bzw. nur schwach mit dem TAC angereichert werden.

Differenzielle Anreicherung (TAC/preTAC)

Genomposition

Legend: ■ TAC I, ■ TAC II

Key features labeled in the chart:

- psaA*, *tmK*, *malK*, *rps16*, *trnG*, *atpI/H/FA*, *rps2*, *rpoB* Operon, *psbC/D*, *psaA/B*, *trnS(GGA)-rps4*, *trnC/KU*, *rbcL*, *rpl20*, *clpP*, *psbB* Operon, *ribosomales Operon*, *ycf2*, *rps12*, *trnI/A*, *trnV*, *ndhF*, *ndhH* Operon, *ndhH*, *trnH*, *ycf1*, *trnM*, *trnD/Y/E*, *rpoC1-In*, *trnL*, *rbcL-3'UTR*, *trnP(UGG)*, *ndhB*, *rm16*, *rm23-4,5-5*, *ycf1* Spike

Interessanterweise sind polycistronische Transkripte in der Regel über die gesamte Länge angereichert. Dazu zählen zum Beispiel das *psbB* Operon (Abb. 24), *psbC/D* Operon, das *psaA/B* Operon (Detailansicht siehe Abb. 25 A) und das *atpI* Operon (Detailansicht Abb. 25 B). Die Assoziation der Transkripte mit dem TAC-Komplex reichen über die gesamte Operonlänge von z.B. *psaA/B* und beinhalten die 5'- und 3'-UTRs. Gleiches gilt für das *psbB* Operon, was möglicherweise auf noch nicht prozessierte Transkripte zurückzuführen ist. Eine ähnliche Assoziation konnte auch für die Transkripte des *rpoB* und *ndhH* Operons beobachtet werden.

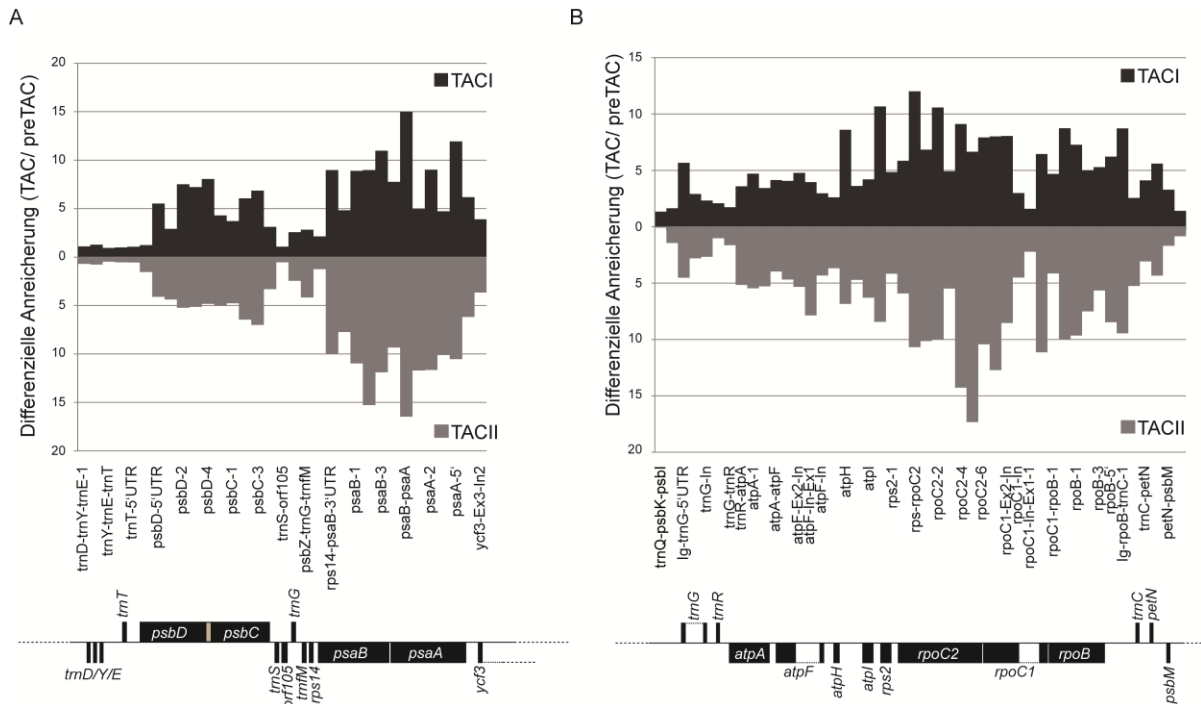


Abb. 25: Detailansicht des *Microarrays* TACI- und TACII-assoziiierter RNAs für das *psbD/C*, *psaA/B*, *atpI* und *rpoB* Gencluster. (A) *psbD* und *psaA/B* Gencluster. Schwarz: TACI-assoziierte RNA. Grau: TACII-assoziierte RNA. Unten: Genomausschnitt des *psbD/C* und *psaA/B* Operons. (B) *atpI* und *rpoB* Operon Schwarz: TACI-assoziierte RNA. Grau: TACII-assoziierte RNA. Unten: Genomausschnitt für das *rpoB* und *atpI* Operon. Die Anreicherungswerte beider TAC-Fractionen stammen aus der Abb. 24, die Wertetabelle (Tab. 9) ist im Anhang 2 zu finden.

Auch wenn das polycistronische *rpoB* Operon nahezu über die gesamte Transkriptionseinheit angereichert vorlag, so sind Fragmente, die Intronregionen von *rpoC1* repräsentieren, weniger stark angereichert als benachbarte Exonregionen im *Tiling-Microarray* (siehe Abb. 24 und Abb. 25 B). Eine Reduktion konnte auch für das *atpF* Intron detektiert werden (s. Abb. 25 B). Dies deutet darauf hin, dass gespleißte gegenüber ungespleißten Transkripten im TAC angereichert sind. Es wurden qualitative Northern Analysen durchgeführt, um den Prozessierungsstatus einzelner RNAs aus dem TAC zu überprüfen (siehe Kap. 3.2.2.1).

Ein weiteres überraschendes Ergebnis war, dass sehr abundante Transkripte wie *psbA*, *rbcl* und die rRNAs *rrn16*, *rrn23*, *rrn4,5* und *rrn5* keine oder nur eine geringe Anreicherung in den TAC-Fractionen zeigten (siehe Abb. 24). Im Gegensatz dazu sind Transkripte, die weniger stark in Chloroplasten exprimiert werden, verglichen mit *psbA* und *rbcl*, um mehr als das fünffache im TAC angereicht. Dazu zählen zum Beispiel das gesamte *rpoB* Operon, die *ycf2* mRNA und *matK*. Zusammenfassend

lässt sich festhalten, dass sich die TAC-Präparationen TACI und TACII zwar in ihrer Komposition und Anreicherung von Proteinen unterscheiden (Krause und Krupinska 2000, Melonek *et al.* 2012), nicht jedoch in ihrer Assoziation mit plastidären Transkripten (siehe Abb. 24). Hinzu kommt, dass die meisten chloroplastidären mRNAs verschiedener Funktionsklassen mit dem TAC-Komplex assoziiert sind und es keinen Unterschied zwischen PEP- und NEP-regulierten RNAs gibt. So sind beispielsweise das PEP-abhängige *psaA/B* Transkript und das NEP-abhängige *rpoB* Operon ungefähr gleich stark angereichert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass im TAC viele polycistronische Transkripte über die gesamte Operonlänge angereichert vorliegen, aber manche Intronregionen unterrepräsentiert sind. Das spricht für eine Anreicherung von unprozessierten und reifen Transkripten im TAC. Zusätzlich konnten alle NEP-abhängigen Transkripte wie das *rpoB* Operon, *accD* und *clpP* im TAC nachgewiesen werden, was aber noch keinen Beweis für das Vorkommen der NEP im TAC darstellt.

3.2.2 Der Kern chloroplastidärer Nukleole enthält prozessierte RNA

Derzeit liegen keine Ergebnisse über den Prozessierungszustand TAC-assoziierter Transkripte vor. Die räumliche Nähe der Transkriptionsmaschinerie zu RNA-bindenden Proteinen, wie beispielsweise den PPR-Proteinen, in den Nukleolen der Chloroplasten, wurde bisher durch proteomische Analysen bestärkt (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012). Die *Microarray* Analyse identifizierte auf plastomweiter Ebene erstmals TAC-assozierte Transkripte. Mit dieser Technik kann jedoch nicht der genaue Prozessierungsstatus einzelner RNAs überprüft werden, da nur schwer zwischen reifen und unprozessierten Transkripten unterschieden werden kann. Dabei wäre der Zusammenhang zwischen dem Prozessierungsstatus TAC-assoziierter RNAs und dem Vorkommen von Prozessierungsfaktoren in den TAC-Komplexen für das Verständnis der plastidären Genexpression von großem Interesse. Um mRNA Reifungsprozesse zu analysieren, wurden deshalb qualitative Northern Analysen zur Untersuchung des Spleißstatus und Edierungsanalysen ausgewählter Transkripte ausgeführt.

3.2.2.1 Spleißstatus von *atpF*

Bei der *Microarray* Analyse deutete sich an, dass einige Transkripte bereits prozessiert in den TAC-Komplexen vorliegen. Es zeichnete sich für das Intron von *rpoC1* sowie für das Intron von *atpF* eine Reduktion dieser PCR-Produkte in der *Microarray* Analyse ab (s. Abb. 24, Abb. 25 B, Kap. 3.2.1). Da es sich bei *rpoC1* um eine sehr schwach exprimierte RNA im Chloroplasten handelt, wurden die Northern Analysen zunächst für *atpF* mit einer *atpF* Exonsonde ausgeführt (s. Abb. 26). Als Kontrolle diente eine *psbD* Sonde zur Überprüfung der allgemeinen RNA Qualität in preTAC- und TAC-Extrakten. Die Sonden wurden auf die Filter hybridisiert, die RNA aus dem preTAC sowie TACI- und TACII-Extrakten enthielten. Die preTAC-Fraktion diente als Kontrolle zum Vergleich von Gesamt-RNA der Chloroplasten und spezifisch TAC-assoziiierter RNA. Aus den beiden TAC-Extrakten konnte nur eine geringe Menge von RNA gewonnen werden. Die Methylenblaufärbungen deuten dies durch das Fehlen ribosomaler RNAs in TACI- und TACII-Fraktionen an.

Bei der Analyse der *psbD* Transkripte akkumulierten drei verschiedene RNA Spezies, die mit ~4400 nt, 3600 nt und 2600 nt wahrscheinlich zwei polycistronischen Vorläufermolekülen und zwei dicistronischen Transkripten des *psbD* Operons entsprechen (Abb. 26, linke Seite, für die Zuordnung der verschiedenen Transkriptformen siehe auch Yao *et al.* 1989). Das Signal bei ~2600 nt stellt wahrscheinlich das dicistronische Transkript von *psbD-psbC* dar. Das Transkript mit einer Länge von ~4400 nt könnte die polycistronische RNA von *psbD-psbC-psbZ* repräsentieren. In Tabak existieren zwei weitere Transkripte des Genclusters, die durch unterschiedliche 5'-Enden gebildet werden und sehr wahrscheinlich in einer Größe von ~3600 nt resultieren (Yao *et al.* 1989). Die Northern Analyse zeigte, dass alle Transkripte des *psbD-psbC* Genclusters sowohl in der preTAC- als auch in der TACI-Fraktion zu finden sind und nicht degradiert vorliegen. Für TACII war die isolierte RNA Menge zu gering, um die *psbD-psbC* Transkripte nachzuweisen.

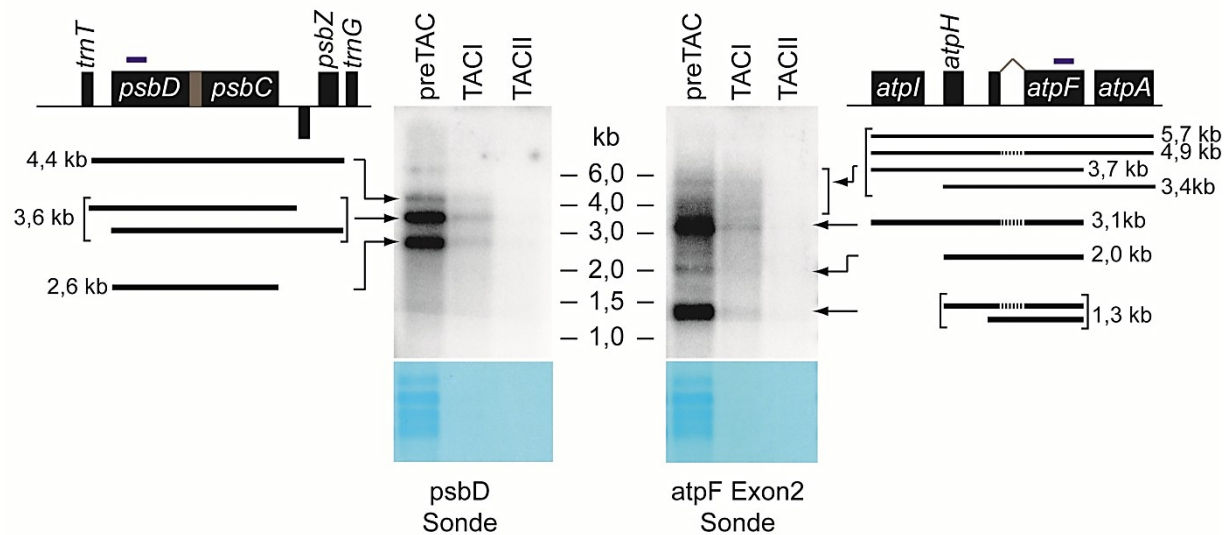


Abb. 26: Qualitative Northern Analyse der Akkumulation von *psbD* und *atpF* Transkripten in der TACI- und TACII-Fraktion. Es wurden 2 µg preTAC-RNA aus Chloroplasten (als Kontrolle), ~210 ng der TACI-assoziierten RNA und ~80 ng der TACII-assoziierten RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit genspezifischen Exon-Sonden für *psbD* bzw. *atpF* hybridisiert. Die Signale wurden entsprechend ihrer Größe den nebenstehenden Transkripten des *psbD/C* oder *atpI* Genclusters zugeordnet (siehe Text). Unterhalb der beiden Filter ist die Methylenblaufärbung als Beladungskontrolle zu sehen. Schwarze Rechtecke kennzeichnen Exons. Das graue Rechteck markiert die Überlappung des *psbD* Gens mit dem *psbC* Gen. Das Intron von *atpF* ist durch eine dünne graue Linien eingezeichnet, die die Exons miteinander verbinden. Blaue Linien oberhalb des Genomausschnitts stellen die Position der verwendeten Sonden dar. Schwarze Linien repräsentieren erwartete Transkripte der jeweiligen Gencluster und gestrichelte Linien markieren das gespleißte Intron von *atpF*.

Für das *atpF* Transkript konnten mehrere RNA Spezies mit der *atpF* Exon 2 Sonde beobachtet werden (s. Abb. 26, rechte Seite). Bei den Transkripten mit Größen von ~5700-3400 nt, die nur in den preTAC-Fractionen detektiert wurden, handelt es sich wahrscheinlich um intronhaltige polycistronische Vorläufer des *atpI* Operons (für die Zuordnung der verschiedenen Längen der Transkripte siehe Miyagi *et al.* 1998, Pfalz *et al.* 2009, Zoschke *et al.* 2012). Die drei stärksten Signale in der preTAC-Fraktion mit der Länge von ~3100 nt, ~2000 nt und ~1300 nt entsprechen Vorläufertranskripten mit oder ohne *atpF* Intron. Interessanterweise konnten diese RNAs auch in der TACI-Fraktion nachgewiesen werden. Bei dem größten dieser drei Transkripte (~3100 nt) handelt es sich wahrscheinlich um eine polycistronische RNA, die *atpI* und *atpH* sowie *atpF* ohne Intron enthält. Das ~2000 nt lange Transkript besteht womöglich aus *atpH* und *atpF* mit Intron. Das Signal bei ~1300 nt könnte

zum einen das *atpF* Transkript mit Intron und zum anderen einen Vorläufer von *atpH* und *atpF* ohne Intron repräsentieren. Das Vorhandensein dieser drei RNA Spezies in TACI spricht dafür, dass es sich bei den beobachteten Transkripten der *Microarray* Analyse sehr wahrscheinlich um bereits gespleißte, prozessierte *atpF* RNA handelt.

Zur Bestätigung der Northern Analysen wurde RNA aus den TAC-Extrakten revers transkribiert und mittels PCR mit genspezifischen Primern des *atpF* Transkripts analysiert (RT-PCR). Dafür wurden die PCR-Primer so konstruiert, dass gespleißte Transkripte (Primerpaare liegen in benachbarten Exons), ausschließlich intronhaltige Transkripte (dabei liegt ein Primer im Intron und der Gegenprimer innerhalb der Exonsequenz) oder intronhaltige Transkripte sowie freie Introns (Primerpaare liegen in der Intronsequenz) amplifiziert werden können. Die resultierenden PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch untersucht (s. Abb. 27). Als Kontrolle für die reverse Transkription diente Gesamt-RNA und als Kontrolle für die PCR Gesamt-DNA aus Chloroplastenextrakten wildtypischer Tabakpflanzen.

In den TACI- und TACII-Fraktionen konnte das gespleißte *atpF*-Transkript mit einer berechneten Größe von ~405 bp mit dem Primerpaar *atpFrevP* und *AatpF* nachgewiesen werden (Abb. 27 oben). Das Signal für das Vorhandensein der Intronsequenz korreliert mit der berechneten Größe von ~432 bp, konnte aber nur in der Gesamt-RNA und in der positiven DNA Kontrolle und nicht in den TAC-Fraktionen gefunden werden (Abb. 27 Mitte). Auch die Intron-Exon überspannende PCR zeigte ein PCR-Produkt der erwarteten Größe von ~754 bp nur in den beiden Kontrollen (Abb. 27 unten). Dass es sich bei den beobachteten Signalen nicht um genomische DNA Kontaminationen handelt, wurde mit Negativkontrollen, die keine reverse Transkriptase (-RT) enthielten, bestätigt. Dieses Ergebnis bestätigt das Vorhandensein bereits gespleißter mRNA in den TAC-Fraktionen.

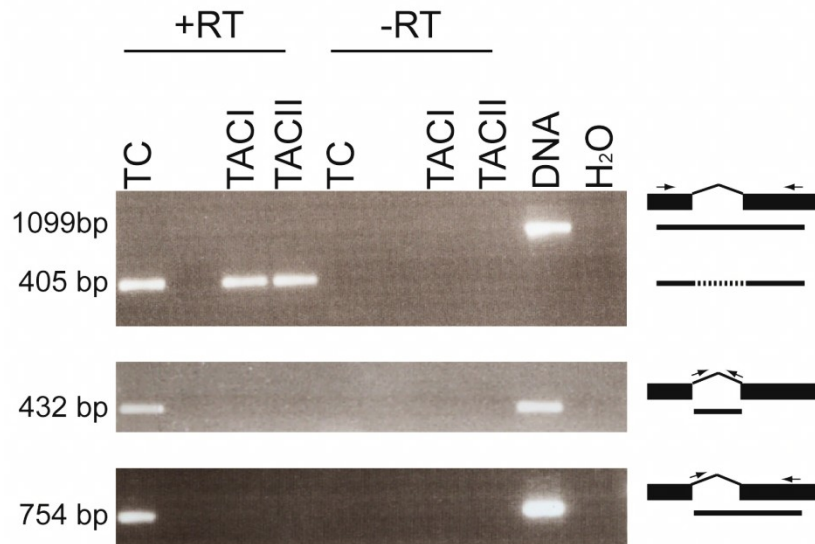


Abb. 27: Qualitative RT-PCR Analyse des *atpF* Transkripts. RNA aus Gesamtchloroplastenextrakten und TACI- sowie TACII-Fractionen wurden mittels reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels PCR analysiert. DNA wurde als positiv und H₂O (Wasser) als negativ Kontrolle für die PCR verwendet. Oben: Die beiden Exon-Primer *atpFrevP* und *AatpF* wurden für den Nachweis gespleißter Transkripte verwendet. Mitte: Das Intron-Primerpaar *atpF_In_rev* und *atpF_In_fw* amplifizieren das freie Intron und Transkripte, die das Intron enthalten. Unten: Eine Intron-Exon-Grenze überspannende PCR erfolgte mit dem Primerpaar *atpFrevP* und *atpF_In_rev* (Liste der Primer im Anhang Tab. 6, Anhang 2). DNA Kontaminationen wurden durch eine -RT-Kontrolle ausgeschlossen, bei der die PCR auf die nicht umgeschriebene RNA erfolgt. Rechtecke kennzeichnen Exons, das Intron ist durch ein offenes Dreieck repräsentiert und erwartete PCR-Produkte sind durch schwarze Linien markiert. Das gespleißte Intron in der PCR ist durch eine gestrichelte Linie eingezeichnet. Pfeile markieren die Positionen der jeweiligen Primer.

3.2.2.2 Edierungsanalysen

Neben dem Spleißen von Introns spielt die RNA Edierung eine weitere zentrale Rolle in der mRNA Reifung. In Tabak existieren 31 Edierungsstellen, die durch C nach U Konversion entweder in der Aminosäuresubstitution oder in der Kreation eines Startcodons resultieren (Hirose *et al.* 1999). Da sich bei der Analyse des *atpF* Transkripts eine Spleißaktivität in den TAC-Komplexen abzeichnete, wurden im Folgenden einige ausgewählte Transkripte auf ihre Edierungsstellen in den TACI- und TACII-Fractionen sowie in der Gesamt-RNA von Chloroplasten aus Wildtyp Tabakpflanzen durch qualitative RT-PCR untersucht. RNA aus dem TAC sowie aus Chloroplasten wurde isoliert und mittels genspezifischer Primer für *rps14*, *atpA* und *ndhD* in cDNA umgeschrieben (Liste der verwendeten Primer siehe Tab. 6, Anhang

2). Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass die PCR eine (für *ndhD*) oder zwei Edierungsstellen (für *rps14* und *atpA*) überspannt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden sequenziert und die Sequenzchromatogramme sind in Abbildung 28 dargestellt.

Für *rps14* existieren zwei Edierungsstellen in Tabak (*rps14eU80SL* und *rps14eU149PL*, Hirose *et al.* 1999). Für *rps14eU80SL* zeigten die Sequenzen der Gesamt-RNA und TACI- sowie TACII-assoziiierter RNA ein Thymin (T) an der Edierungsstelle. Das bedeutet, dass diese Stelle in allen untersuchten Extrakten vollständig ediert vorlag. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Edierungsstelle *atpAeU791PL* gefunden. Diese war in den TACI-Komplexen und auch in der Kontroll-RNA voll ediert (T). Für TACII stehen die Ergebnisse noch aus. Die zweite Edierungsstelle von *rps14* (*rps14eU149PL*) wird in Tabak partiell ediert (Hirose *et al.* 1998). Die untersuchten Sequenzabschnitte für *rps14eU149PL* enthielten an der Edierungsstelle tatsächlich ein C und ein T sowohl in den TAC-Fraktionen als auch in der Kontroll-RNA. Das Verhältnis von C zu T lag in allen drei Proben zugunsten des Thyminrestes. Die zweite Edierungsstelle in *atpA* (*atpAeU795SS*) befindet sich an der dritten Position des Codons. Ihr Edierungsstatus hat also keinen Einfluss auf die hier kodierte Aminosäure (Hirose *et al.* 1999). Das gleichzeitige Auftreten des Cytosin- und Thymin-Signals an dieser Stelle zeigte, dass in der TACI-Fraktion und in der Gesamt-RNA diese Edierungsstelle partiell ediert vorliegt. Das Verhältnis von C zu T liegt auf Seiten des Cytosinrestes, aber die Edierungseffizienz unterscheidet sich nicht zwischen Kontrolle und TACI. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die RNAs im TAC-Komplex bereits prozessiert vorliegen und dass ein enger Kontakt zwischen der RNA und ihren Reifungsfaktoren im TAC sehr wahrscheinlich ist.

Die Edierungsstelle von *ndhD* (*ndhDeU2TM*) ist in Tabak ebenfalls partiell ediert. Die C nach U Edierung an dieser Position ist notwendig für die Bildung des Startcodons und damit für die Translation der *ndhD* mRNA (Hirose und Sugiura 1997). Eine partielle Edierung konnte eindeutig für die Gesamt-RNA aus Chloroplasten, nicht aber für die TAC-assoziierten RNAs, in den untersuchten Sequenzabschnitten gefunden werden. Das Verhältnis von C zu T an der Edierungsstelle in der Gesamt-RNA ist ausgeglichen, beide Reste liegen zu gleichen Teilen vor. Ein kleines Signal für den Thyminrest wurde an der Edierungsstelle in den TAC-Fraktionen detektiert. Jedoch liegt das Verhältnis C zu T deutlich auf der Seite des Cytosinrestes

verglichen zur Gesamt-RNA. Das spricht dafür, dass das Edierungsereignis für *ndhD* noch nicht in den TAC-Fractionen stattgefunden hat.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vier von fünf Edierungsstellen der hier untersuchten Transkripte bereits in den TAC-Komplexen ediert und damit prozessiert vorliegen. Ob das mit dem Vorkommen einzelner Prozessierungsfaktoren in den TACs korreliert, bleibt weiterhin offen.

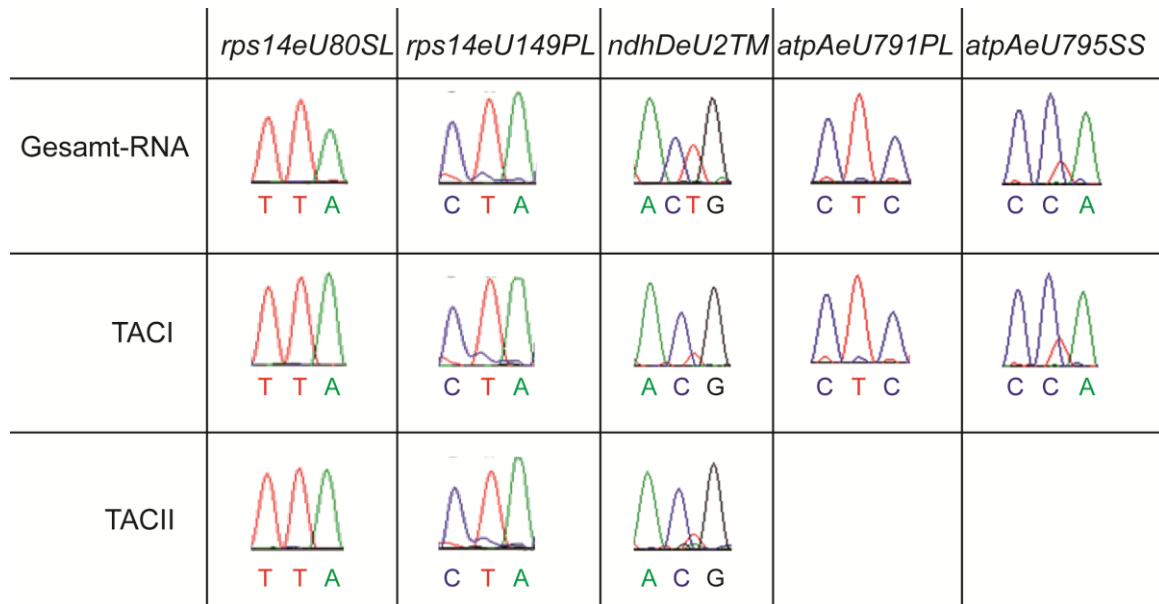


Abb. 28: Analyse ausgewählter Edierungsstellen durch Sanger-Sequenzierung. Nach reverser Transkription wurden cDNA Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die jeweils zweite hier gezeigte Base stellt die Edierungsstelle dar. Das gleichzeitige Auftreten eines Cytosin- und Thymin-Signals deutet auf eine partielle Edierung hin. Das Verhältnis von C zu T gibt den Fortschritt der Edierung in den TAC-Fractionen an ($T > C$ = Stelle bereits ediert, $T < C$ = Stelle nicht bzw. teilweise ediert).

4. Diskussion

4.1 Qualitativ neue Erkenntnisse über die PEP durch die Anwendung der ChIP-on-Chip Technik

In den Chloroplasten der dikotylen Pflanzen sind drei verschiedene RNA Polymerasen aktiv. Dazu zählt die plastidär kodierte PEP und zwei Versionen der kernkodierten NEP, welche durch die Gene *RpoTp* und *RpoTnp* repräsentiert werden. Bisher wurden die Zielgene dieser RNA Polymerasen genetisch bestimmt. Dabei wurde die RNA Akkumulation vorwiegend in Δrpo Mutanten untersucht, welche die Ziele von PEP und NEP aufzeigten (Hajdukiewicz *et al.* 1997b, Kühn *et al.* 2009). Allerdings müssen diese Analysen unter Vorbehalt betrachtet werden, da *Knockouts* der PEP und auch der beiden kernkodierten Polymerasen pleiotrope und starke phänotypische Effekte zur Folge haben. Im Fall des Fehlens der PEP erscheinen die Pflanzen albinotisch (Allison *et al.* 1996). Für NEP *Knockouts* sind Blattdeformationen typisch, die oft mit einem Ausbleichen sowie einem verlangsamtem Wachstum der Pflanzen einhergehen (Baba *et al.* 2004, Hricova *et al.* 2006, Kühn *et al.* 2009). Diese schwerwiegenden sekundären Effekte können möglicherweise mit der Transkription der verbleibenden RNA Polymerase interferieren. Der Verlust der Genexpression im Chloroplasten führt beispielsweise zu sogenannten retrograden Signalen, die im Zellkern eine Neuprogrammierung der Genexpression auslösen (Woodson und Chory 2008). Dies hat auch einen Effekt auf die Expression der kernkodierten NEP Gene (Emanuel *et al.* 2004, Emanuel *et al.* 2006). Demnach führt eine modifizierte PEP Aktivität auch zu einer veränderten NEP Aktivität und umgekehrt (Zhelyazkova *et al.* 2012). Da die PEP Gene im Chloroplasten durch die NEP transkribiert werden, wird es schwierig einen eindeutigen NEP Phänotyp auch in einem Doppel-*Knockout* beider NEP Gene (*RpoTp* und *RpoTnp*) zu bestimmen. Schließlich führt ein *Knockout* der chloroplastidären und mitochondrialen *RpoTnp* zum Verlust der Komplex I Expression und damit zu einer verminderten Aktivität der mitochondrialen Atmungskette (Kühn *et al.* 2009). Ein Defekt in den Mitochondrien beeinflusst die chloroplastidäre Genexpression (Leister 2005, Van Aken und Whelan 2012), sodass die Identifikation der tatsächlichen Ziele der plastidären RNA Polymerasen

problematisch sein kann. Diese komplexen Wechselbeziehungen verkomplizieren die Analyse plastidärer Transkriptionsmutanten.

Ein direkter Ansatz, um die Gene zu charakterisieren, die durch eine spezifische Polymerase bedient werden, sind sogenannte ChIP (Chromatin Immunopräzipitation) Experimente. Die gemeinsame Präzipitation einer spezifischen RNA Polymerase zusammen mit einer DNA stellt zwar keinen Beweis für die Aktivität der Polymerase an der betreffenden Stelle dar, kann aber ein Hinweis auf die funktionelle Interaktion zwischen DNA und dem Enzym liefern. Bisher wurde diese Technik weitgehend für die Charakterisierung von bakteriellen (Wade *et al.* 2007) sowie eukaryotischen Polymerasen, im speziellen für die RNA Pol II (Sims *et al.* 2004), verwendet. Eine Vielzahl von Studien der bakteriellen RNA Polymerase unter verschiedenen Bedingungen und genetischen Hintergründen konnte eine regulatorische Rolle dieses Enzyms belegen (Wade *et al.* 2007). So konnten Reppas und Kollegen (2006) beispielsweise zeigen, dass die RNAP in Bakterien nur unter bestimmten Umweltbedingungen von der Transkriptionsinitiation in die Elongationsphase übergeht (Reppas *et al.* 2006). ChIP Analysen sind demnach ein hilfreiches Werkzeug für die Identifikation von spezifischen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (Lee *et al.* 2007), dem Verteilungsmuster von verschiedenen modifizierten Histonen (Johnson *et al.* 2002) und der Bewegung der RNAP und ihren assoziierten Proteinen auf der genomischen DNA (Mooney *et al.* 2009).

Erste Versuche zur Charakterisierung PEP-gebundener DNA im Chloroplasten bestanden aus der Visualisierung restriktionsverdauter DNA, die aus TAC (*transcriptionally active chromosome*) Präparationen stammten. Diese Studie zeigte, dass das gesamte plastidäre Chromosom in den TACs vorhanden war, konnte aber kein detailliertes Bild über die tatsächlich transkribierte DNA geben (Reiss und Link 1985). Immunopräzipitationen des chloroplastidären RpoA Proteins mit einem Antikörper, der gegen das gesamte RpoA Protein gerichtet ist, konnten 14 an die PEP gebundene DNA Regionen identifizieren (Yagi *et al.* 2012). Dabei wurden Anreicherungen für *psbA*, *rbcL*, *psbD*, das *rrn* Operon, *trnD/Y* und *psaA* gezeigt (Yagi *et al.* 2012). Auf die gleiche Weise wurden Anreicherungen von *psbA*, *rbcL*, *psaA* und das *rrn* Operon in Koimmunopräzipitationen von RpoB gefunden (Zhong *et al.* 2013). Gleichermäßen identifizierte die ChIP-qPCR die Zielregionen *psbA*, *psbC/D*, *psaA/B* sowie *psbB/T* für SIG5 und *rbcL*, *psbB/T*, *psaA/B*, *clpP* sowie *psbEFLJ* für SIG1 (Hanaoka *et al.* 2012, Noordally *et al.* 2013). Dies deutet an, dass die PEP mit

verschiedenen Genen der Photosynthese assoziiert. Umfassende Analysen der Bindungspräferenzen der PEP über das gesamte Chloroplastengenom fehlten jedoch bislang und waren daher Gegenstand dieser Arbeit.

4.1.1 Präzipitation von PEP-Holokomplexen

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die stabile Markierung des RpoA Proteins in einem transplastomischen Ansatz mit einem C-terminalen HA-Epitop (siehe Abb. 4, S. 45) und durch die Applikation hochreiner monoklonaler HA-Antikörper die erfolgreiche Immunpräzipitation des HA-markierten Proteins ermöglicht (Abb. 14, S. 59). Proteinanalysen legen nahe, dass zusammen mit RpoA:HA intakte RNA Polymerasen präzipitiert wurden (s. Abb. 12, S. 56). Diese Daten zeigen, dass es möglich ist das HA-markierte RpoA Protein innerhalb eines intakten PEP Komplexes zu finden und diesen mittels Immunpräzipitationen anzureichern. Neben den Kernuntereinheiten der PEP (RpoA, RpoB, RpoC1 und RpoC2) kopräzipitierten weitere Polypeptide mit RpoA:HA, welche PEP-assoziierte Faktoren wie zum Beispiel die PAPs oder pTACs repräsentieren könnten (Pfalz *et al.* 2006, Steiner *et al.* 2011). Die Identität der in den Präzipitaten von RpoA enthaltenen Proteine können in Zukunft durch massenspektrometrische Analysen aufgeklärt werden.

4.1.2 PEP assoziiert mit weiten Bereichen des Chloroplastengenoms: weitesgehende Bestätigung genetischer Analysen

Die anschließende Analyse der mit RpoA:HA kopräzipitierten DNA ermöglichte erstmals die Identifikation der Hauptziele der PEP auf plastomweiter Ebene. Der in dieser Arbeit verwendete ChIP-on-Chip Ansatz bestätigt, die unter Kap. 4.1 genannten Zielregionen früherer ChIP Experimente und setzt diese Gene mit dem gesamten Tabak-Plastom in Zusammenhang (siehe Abb. 15, S. 61). Die Hauptziele der PEP sind das rRNA Operon und mehrere Gene der Photosynthese. Zu den am stärksten angereicherten DNA Regionen gehören *psbA*, *psbC/D*, *psaA/B* und *rbcl*. Außerdem konnte eine Assoziation der PEP zu einigen tRNAs gefunden werden, darunter befinden sich z.B. *trnI*, *trnA* und die *trnV-trnM* Region. Insgesamt betrachtet zählen alle diese RNAs zu den abundantesten RNAs in Tabak und die gemeinsame Anreicherung von PEP und ihren zugehörigen DNA Abschnitten reflektiert in den meisten Fällen die Transkriptionsraten im grünen Gewebe (Legen *et al.* 2002,

Zhelyazkova *et al.* 2012). Bereits in früheren Studien wurde für die PEP eine Beteiligung an der Transkription der rRNAs (Sriraman *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2003) sowie einigen tRNAs (Kanamaru *et al.* 2001, Legen *et al.* 2002, Ishizaki *et al.* 2005) postuliert. Die in dieser Arbeit gezeigte Assoziation der PEP mit diesen DNA Regionen bestärkt diese Aussage.

Gene, die hauptsächlich unter der Kontrolle von NEP Promotoren stehen, wie das *rpoB* Operon, welches für drei der vier Kernuntereinheiten der PEP kodiert, *accD*, *rpoA* sowie *clpP*, waren nicht angereichert (siehe Abb. 15, S. 61). Dementsprechend hat RpoA bzw. die PEP *in vivo* eine eindeutige Präferenz für Gene der Photosynthese, rRNA Gene und einige tRNA Gene. Das lässt vermuten, dass die PEP selektiv und exakt ihre Promotoren erkennt.

Lediglich die geringe Anreicherung des *psbB* Operons stellt eine Ausnahme dar. Das Operon kodiert für ein pentacistronisches Transkript mit den Untereinheiten des Cytochrom-*b₆f*-Komplex (Stoppel und Meurer 2013). Genetische Studien zeigten, dass *psbB* in erster Linie durch die PEP transkribiert wird (Hajdukiewicz *et al.* 1997b, Legen *et al.* 2002). Die Anreicherung für das gesamte *psbB* Operon ist allerdings nicht viel stärker als die der NEP-abhängigen Gene *accD* und *clpP* (Abb. 15, S. 61). Möglicherweise wird das *psbB* Operon schneller transkribiert als andere plastidäre Gene bei gleichbleibenden Initiationsraten. Dies resultiert in einer höheren Transkriptionsrate in *run-on* Experimenten (Legen *et al.* 2002), während die Anreicherungswerte in ChIP-on-Chip Analysen eher gering sind. Das heißt, dass zu einem untersuchten Zeitpunkt jeweils nur einige wenige PEP Enzyme mit der *psbB* DNA assoziiert wären. Eine andere Möglichkeit Diskrepanzen zwischen *run-on* und ChIP-on-Chip Experimenten zu erklären, liegt in der Tatsache, dass die Pflanzen zu verschiedenen Zeiten bzw. Entwicklungsstadien untersucht wurden. Die Analyse sieben Tage alter Pflanzen gegenüber ausgebildeten Blättern sechs Wochen alter Pflanzen (Legen *et al.* 2002), legt die Vermutung nahe, dass das *psbB* Operon eventuell zu einem anderen Zeitpunkt/ Entwicklungsstadium transkribiert wird. Um die Transkription des *psbB* Operons genau zu verstehen, sind weitere Kenntnisse über die Kinetik der PEP Transkription erforderlich.

4.2 Lichtaktivierte Assoziation von PEP mit ausgewählten DNA Regionen

Durch den Vergleich der PEP Assoziation mit ihren Zielregionen zwischen im Licht gewachsenen und dunkeladaptierten Pflanzen, können die am stärksten lichtregulierten Gene auf transkriptioneller Ebene bestimmt werden. Die Frage welcher Anteil des Chloroplastengenoms einer PEP-abhängigen Lichtaktivierung unterliegt, konnte hier beantwortet werden (siehe Abb. 15, S. 61 und Abb. 16, S. 63): Ungefähr 75% des Chloroplastenchromosoms sind stärker im Licht als im Dunkeln mit der PEP assoziiert. Zu den am stärksten und signifikant angereicherten Genen unter Licht- gegenüber Dunkelbedingungen zählen *psbA*, *psbC/D*, *psaA/B*, *rbcL* und das rRNA Operon (p-Werte $< 10^{-6}$ für Licht, p-Werte $\geq 0,5$ für Dunkel, Wertetabelle in Finster *et al.* (2013)). Quantitative Aussagen über die Menge präzipitierter DNA können mittels *Microarray*-basierten Daten allerdings nicht abgelesen werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Erkenntnisse der ChIP-on-Chip Analyse mittels quantitativer Dot blot DNA Hybridisierungen erweitert (siehe Abb. 17, S. 64). Hier konnte direkt gezeigt werden, dass es in den dunkeladaptierten Pflanzen zu einer Reduktion der PEP Bindung um fast 50% mit allen untersuchten Genen (*psbA*, *psbD*, *rbcL*, *rrn16* und *rrn23*) kommt.

Seit langem ist eine lichtabhängige Regulation der Transkription für einige individuelle chloroplastidäre Gene bekannt, ohne dass dies mit einer bestimmten Polymerase verknüpft werden konnte. Dazu zählen die Gene *psbA*, *rbcL* sowie *rrn16* (Gamble und Mullet 1989, Klein und Mullet 1990, DuBell und Mullet 1995, Chun *et al.* 2001), *psbD/C* (Christopher und Mullet 1994, Thum *et al.* 2001, Mochizuki *et al.* 2004) und *psaB* (Klein und Mullet 1987). Des Weiteren assoziiert nach der Lichtaktivierung eine Vielzahl von tRNA Genen (z.B. *trnD/Y/E*, *trnL*, *trnV-trnM*, *trnI*, *trnA*) mit der PEP. Eine lichtabhängige Regulation der plastidären tRNAs wurde bisher wenig beachtet. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten liefern einen direkten Beweis, dass die PEP eine lichtabhängige Regulation der Photosynthesegene unterstützt und daneben auch lichtabhängig an Gene der tRNAs bindet. Die einzige bekannte tRNA für die bisher eine lichtabhängige Assoziation an die PEP gezeigt wurde, ist der tricistronische Vorläufer der *trnD/Y/E* Region (Yagi *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit sind neben der *trnD/Y/E* Region die Gene für *trnG*, *trnL*, *trnV-trnM*, *trnI*, *trnA* und *trnR-trnN* lichtabhängig mit der PEP assoziiert. Zusätzlich enthüllte die ChIP-on-Chip Analyse unter den hier gewählten Lichtbedingungen eine

Assoziation zu Genen der ribosomalen RNAs (gesamtes *rrn* Operon, siehe Abb. 15, S. 61 und Abb. 16, S. 63). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Transkription der RNA Komponenten des chloroplastidären Translationsapparats bei Licht angeschaltet wird. Tatsächlich wurde bereits ein Anstieg der Transkriptionsaktivität von rRNA Genen nach Erhöhung der Lichtdosis in *Sinapis alba* (Senf) beschrieben (Baena-Gonzalez *et al.* 2001). Die lichtinduzierte Assoziation mit rRNA und tRNA Genen in grünem Gewebe könnte vermutlich durch die Regeneration des Ribosomen- und tRNA-Reservoirs begründet sein, das sich eventuell in jungem Gewebe zwischen Tag und Nacht verändert (Zhao *et al.* 1999). Eine zeitauflösende ChIP-on-Chip Analyse ist in Zukunft notwendig, um genauere Aussagen über die Assoziation der PEP mit ribosomalen RNAs und tRNAs in Bezug auf den Wechsel zwischen Dunkelheit und Licht treffen zu können.

Untersuchungen des zirkadianen Transkriptionsprofils in *Arabidopsis thaliana* geben Hinweise darauf, dass ca. 70% des Chloroplastengenoms zirkadian reguliert werden (Michael *et al.* 2008, Noordally *et al.* 2013). Allerdings zeigte die Proteinmenge von RpoA über einen Zeitraum von 56 Stunden keine starken Fluktuationen (s. Abb. 30, Anhang 1), sodass RpoA bzw. die PEP wahrscheinlich kaum zirkadian reguliert wird. Ähnliche Beobachtungen existieren für die Grünalge *Chlamydomonas*. Hier ist die Transkription der plastidären Gene auch durch die zirkadiane Uhr reguliert (Salvador *et al.* 1993, Hwang *et al.* 1996), aber die PEP unterliegt keiner zirkadianen Kontrolle (Kawazoe *et al.* 2012). Eine Regulation der PEP Aktivität wird auf posttranslationaler Ebene (Kawazoe *et al.* 2012) oder über Sigmafaktoren vermutet, die eine zirkadiane Abstimmung kontrollieren (Noordally *et al.* 2013). Zukünftige Analysen über den gesamten Tages- und Nachtverlauf können helfen, weitere Erkenntnisse über zirkadian regulierte Bindung der PEP an bestimmte DNA Regionen zu erlangen.

4.2.1 Dunkelaktivierte Assoziation von PEP mit wenigen Genen

Insgesamt betrachtet, wiesen nur 75 der 302 PCR-Produkte des *Microarrays* eine stärkere Assoziation der PEP im Dunkeln als im Licht auf (Vergleich Licht: 227 von 302 PCR-Produkten). Dabei zeigte nur eine einzige Sonde (*petL-petG-trnW/P*, kodiert für zwei Untereinheiten des Cytochrom-*b₆f*-Komplexes und zwei tRNAs) eine stärkere Anreicherung, als alle anderen Sonden (siehe Abb.15, S. 61 und Abb. 16, S. 63). Weitere weniger starke Anreicherungen wurden für Gene des NDH-Komplexes

gefunden. Ob dies mit einer verstärkten Transkription einhergeht und somit funktionell relevant ist, muss in Zukunft untersucht werden. Beide Komplexe spielen beim photosynthetischen Elektronentransport eine Rolle - insofern ist die Assoziation mit der PEP gerade im Dunkeln eine Überraschung.

4.2.2 Wie wird die PEP-DNA Assoziation reguliert?

Ob PEP im Licht aktiviert wird oder ob vielmehr die Dissoziation von der DNA im Dunkeln ein aktiver Vorgang ist, bleibt unklar. Möglicherweise findet eine Regulation über Phosphorylierung statt. Es wird vermutet, dass die lichtabhängige Aktivierung über die lichtinduzierte Expression von kernkodierten plastidären Sigmafaktoren (Lerbs-Mache 2011) oder durch posttranslationale Phosphorylierungen der PEP (Kern)-Untereinheiten und/ oder σ -Faktoren vermittelt wird (Baginsky *et al.* 1997, Isono *et al.* 1997b, Baginsky *et al.* 1999, Kanamaru *et al.* 1999, Tan und Troxler 1999, Lerbs-Mache 2011). Neben den σ -Faktoren scheinen die TAC-Komponenten eine wichtige Rolle als Regulatoren der Transkriptionsregulation zu spielen. Sie sind bei der Adaption an Umwelt- und Lichteinflüssen in den Chloroplasten beteiligt. Steiner und Kollegen (2011) haben neben den Rpo-Untereinheiten zehn weitere Untereinheiten des PEP Komplexes identifiziert, die als PEP-assoziierte Proteine (PAPs) oder pTACs (Pfalz *et al.* 2006) bekannt sind. Die Inaktivierung der PAPs resultiert meist in den gleichen makro- und molekularbiologischen Phänotypen, wie sie für Δrpo Mutanten bekannt sind (Steiner *et al.* 2011). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die PAPs in Bezug auf die PEP Aktivität eine besondere Stellung unter den vielen Nukleoid- bzw. TAC-Komponenten einnehmen. PAPs können eine Vielzahl von Funktionen ausüben, so sind sie unter anderem in Veränderungen des Redoxzustandes, in Phosphorylierungsprozessen und der Phytochrom-abhängigen Lichtsignalwirkung involviert (zusammengefasst in Yu *et al.* 2013). Es ist wahrscheinlich, dass sie ein Bindeglied zwischen der plastidären Transkription und den Lichtsignalen darstellen und die PEP Aktivität beeinflussen (Arsova *et al.* 2010). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus bleibt weiter unklar, aber zukünftige Studien in Bezug auf die Redoxregulation und Phosphorylierung einzelner PEP Untereinheiten, insbesondere der PAPs und pTACs, können Einblicke in diesen komplexen Regulationsweg geben.

4.3 Die PEP assoziiert hauptsächlich mit den abundantesten mRNAs und vielen tRNAs

4.3.1 Die RIP-Chip Technik ist ein geeignetes Werkzeug zur Identifikation aktiv transkribierter RNA durch die PEP

Es bleibt bis heute unklar, welche Polymerase (PEP oder NEP) tatsächlich an bestimmten Genen aktiv transkribiert (Liere *et al.* 2011). Die bisher in dieser Arbeit gezeigten Studien lieferten zwar den Beweis, dass die PEP mit ihren Zielregionen interagiert. Diese Analysen geben allerdings keinen Aufschluss über die tatsächliche Aktivität der RNA Polymerase an den einzeln betrachteten Genen. Gene, die durch die PEP transkribiert werden, konnten bisher indirekt über Analysen des Transkriptoms der Plastiden in PEP-defizienten Tabakpflanzen (Legen *et al.* 2002) sowie in ribosomdefizienten Pflanzen der Gerste (Zhelyazkova *et al.* 2012) und durch die Analyse des Transkriptoms in Anwesenheit eines PEP Inhibitors (Demarsy *et al.* 2006) aufgeklärt werden. Wie aber extrazelluläre Reize, z.B. Licht, einen direkten Einfluss auf die Transkription haben, lässt sich *in vivo* am besten durch die Messung naszierender RNA bestimmen. Dafür wurde in dieser Arbeit die klassische ChIP-on-Chip Methode modifiziert: Naszierende RNA wurde nach der Immunopräzipitation des epitopmarkierten RpoA Proteins aus Gesamtchloroplastextrakten isoliert und mit Tabak-Chloroplastengenom-*Tiling-Microarrays* (RIP-Chip) untersucht (siehe Abb. 19, S. 68). Dies ermöglichte erstmals die spezifische Untersuchung der Aktivität einer einzelnen Polymerase unter verschiedenen Lichtbedingungen *in vivo*. Analoge Methoden wurden bereits erfolgreich für die Untersuchung von kotranskriptionalen RNA Prozessierungsschritten an naszierenden Transkripten in menschlichen Zellen verwendet (Kaneko und Manley 2005, Bittencourt *et al.* 2008, Bittencourt und Auboeuf 2012). Bei der Untersuchung von PolV Transkripten konnten mittels RIP-Chip in *Arabidopsis thaliana* bisher unbekannte, nicht kodierende RNAs identifiziert werden (Rowley *et al.* 2013).

4.3.2 Die PEP ist besonders stark mit *psbA* und *rbcL* assoziiert

Die Auswertung der RIP-Chip Analysen zeigte eine starke Anreicherung verschiedener plastidärer RNA Spezies. Seit langem wurde die PEP als wichtigstes Enzym für die Transkription der Gene des Photosystems beschrieben (Hajdukiewicz

et al. 1997b, Pfalz *et al.* 2006, Gao *et al.* 2011, Kindgren *et al.* 2012, Yagi und Shiina 2012). Allerdings konnten nur *psbA* und *rbcL* sowie viele tRNAs unter den am stärksten angereicherten RNAs identifiziert werden (siehe Abb. 19, S. 68). Die Assoziation zur *psbA* und *rbcL* mRNA im Licht korreliert mit der in den ChIP-on-Chip Analysen beobachteten DNA Assoziation beider Gene (siehe Abb. 15, S. 61 und Abb. 19, S. 68). Im Gegensatz dazu zeigten andere PEP-abhängige mRNAs wie *psbC/D* und *psaA/B* sowie die RNA des *psbB* Operon im Vergleich zur *psbA* mRNA eine geringere Anreicherung (s. Abb. 19, S. 68). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die ribosomalen RNAs gefunden, welche hauptsächlich durch die PEP transkribiert werden (Sriraman *et al.* 1998, Suzuki *et al.* 2003). Wie es zu diesen Diskrepanzen zwischen ChIP-on-Chip und RIP-Chip Analysen kommt, wird im folgenden Kapitel näher aufgeführt.

Obwohl die DNA Assoziation für die Gene *psbA* und *rbcL* im Dunkeln reduziert ist, war die erhöhte Anreicherung beider mRNAs in den dunkeladaptierten Pflanzen eine ungewöhnliche Entdeckung. Warum ist die *psbA* mRNA im Dunkeln so stark angereichert? Die *psbA* mRNA zählt zu den abundantesten RNAs in Tabak (Legen *et al.* 2002) und kodiert für das D1 Protein des PSII Komplexes. Eine kontinuierliche Expression von *psbA* ist notwendig, um die Funktionalität des PSII und damit die Photosynthese aufrechtzuerhalten (Klein und Mullet 1987, Pokorska *et al.* 2009, Link *et al.* 2012). Die Assoziation der PEP zum *psbA* Gen ist im Dunkeln zwar reduziert, bleibt aber zu einem geringen Anteil gebunden (Abb. 17, S. 64). Dies führt zu der Vermutung, dass nachts auch eine geringe Bindung der PEP zur Transkription der *psbA* mRNA führt und folglich den mRNA Haushalt für *psbA* sichert, um die hohen Umsatzraten von D1 nicht zu gefährden. Damit es bei Tagesanbruch bzw. Belichtung nicht zum Zusammenbrechen der Photosynthese kommt, könnte so genügend Transkript für die Translation des D1 Proteins bereitgestellt sein. Denn schon seit langem wurde eine lichtinduzierte Translation der *psbA* mRNA postuliert (Klein und Mullet 1986, Klein *et al.* 1988, Klein 1991). Dabei erhöht Licht die Synthese des Genprodukts während die Transkriptmenge unverändert bleibt (Klein und Mullet 1986, Klein *et al.* 1988).

4.3.3 tRNAs sind präferentiell mit der PEP assoziiert

Interessanterweise sind viele tRNAs, wie *trnA(UGC)*, *trnI(GAU)*, *trnL(UAA)*, *trnV(UAC)-trnM(CAU)*, *trnV(GAC)* und *trnD/Y/E*, mit der PEP assoziiert. Eine Beteiligung der PEP an der Transkription einiger tRNAs konnte bereits nachgewiesen werden (Kanamaru *et al.* 2001, Legen *et al.* 2002, Ishizaki *et al.* 2005), fand aber bislang kaum Beachtung. Der Vergleich der DNA und RNA Assoziation zeigt, dass die tRNA Gene mit der PEP assoziiert, aber nicht stärker angereichert sind als die Photosynthesegene (Vergleich z.B. DNA Regionen *trnG*, *trnL* und *trnV-trnM* mit *psbA*, *psbC/D* oder *psaA/B*, s. Abb. 15, S. 61). Dieses Verhältnis kehrt sich bei der RNA Assoziation um: tRNAs wie *trnG*, *trnD/Y/E*, *trnL* oder auch *trnV-trnM* sind stärker mit der PEP assoziiert als z.B. die mRNAs von *psbC/D* oder *psaA/B* (s. Abb. 19, S. 68). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die dieses Phänomen und die Diskrepanzen zwischen der DNA und RNA Interaktion der PEP erklären könnten:

(i) Die Transkriptionsinitiation der Bakterien ist durch mehrere Abbrüche der RNA Synthese charakterisiert, bevor es zum Übergang in die Elongationsphase kommt (Reppas *et al.* 2006, Bochkareva und Zenkin 2013). Da die PEP bakteriellen Ursprungs ist (Hu und Bogorad 1990), wäre ein ähnliches Szenario auch in den Chloroplasten denkbar. Folglich könnten DNA-assoziierte PEP Moleküle nicht prozessiv sein. Das führt vermutlich zu kurzen RNA Fragmenten (Abb. 29 A) und die RIP-Chip Signale werden durch diese kurzen RNA Bruchstücke repräsentiert. Diese erzeugen die gleiche Signalstärke wie auch die vollständigen Transkripte und können nicht voneinander unterschieden werden. Ob die Akkumulation von *psbA*, *rbcL* oder den tRNAs in RpoA:HA Immunopräzipitaten durch diese kleinen Fragment begründet ist, kann in Zukunft mittels PAGE-Northern oder auch RIP-*Sequencing* (RIP-Seq) Techniken nachgewiesen werden.

(ii) Bei der Kartierung von RNA Polymerase Pol II im menschlichen Genom zeigte sich, dass die Pol II an Promotoren gebunden wird ohne dabei detektierbare Transkripte hervorzubringen (Kim *et al.* 2005, Guenther *et al.* 2007). Diese Korrelation lässt sich durch eine pausierende oder unproduktive RNA Polymerase erklären (Gilchrist *et al.* 2009). Es wäre demnach vorstellbar, dass die PEP zwar mit einem Großteil der plastidären Gene assoziiert, hier aber keine aktive Transkription stattfindet (siehe Abb. 29 B). So könnte sich die Transkriptionseffektivität der PEP zwischen Genen der Photosynthese und den tRNA Genen unterscheiden. Die starke

Anreicherung der tRNAs sowie *psbA* und *rbcL* lässt eine aktive Transkription vermuten, wohingegen z.B. *psbC/D* und *psaA/B* nicht transkribiert werden.

(iii) Die Gene der tRNAs sind vergleichsweise kurz zu Genen der mRNAs der Chloroplasten in Tabak (Shinozaki *et al.* 1986). Demnach könnte die Anzahl von PEP Enzymen auf langen Genen wesentlich höher ausfallen als auf kurzen (siehe Abb. 29 C). Das resultiert in einer starken Anreicherung in ChIP-on-Chip Experimenten (vgl. z.B. *psbA* mit *trnG* in Abb. 15, S. 61). Ein umgekehrtes Verhältnis im RIP-Chip setzt dann eine starke Dissoziation der PEP von langen RNAs voraus (s. Abb. 29 C), sodass diese kaum oder nicht mehr nachweisbar sind. Kurze RNAs (z.B. tRNAs) dissoziieren dagegen nicht oder nur schwach von der Polymerase, was möglicherweise durch die kleeblattartige Struktur bedingt ist. Folglich können sie noch in RpoA Immunopräzipitationen detektiert werden (Vergleich von *psbC/D* zu *trnL*, s. Abb. 19, S. 68). Allerdings spricht die RNA Assoziation der PEP zu *psbA* und *rbcL* (beides vergleichsweise lange RNAs) gegen diese Hypothese.

(iv) Eine weitere Möglichkeit für die starke Assoziation der PEP zu tRNAs könnte auf einer unterschiedlichen Dissoziation von mRNA und tRNA Transkripten nach der Transkriptionstermination beruhen (siehe Abb. 29 D). Dabei könnte die Dissoziationsgeschwindigkeit vom Prozessierungszustand der Transkripte abhängig sein. Die plastidären tRNAs liegen stark strukturiert vor (Vogel und Hess 2001) und sie sind die am meisten modifizierten RNA Moleküle (Delannoy *et al.* 2009). Aufgrund dieser starken Strukturierung finden die tRNA Modifikationen eventuell erst posttranskriptional statt und die PEP dient möglicherweise als eine Art Landeplattform für tRNA modifizierende Enzyme. Für die Prozessierung der 5'- und 3'-Enden der Vorläufer-tRNAs in Chloroplasten sind RNaseP und RNaseZ verantwortlich (Canino *et al.* 2009, Gobert *et al.* 2010). Die räumliche Nähe beider Enzyme zur PEP konnte vor kurzem bestätigt werden (Majeran *et al.* 2012). Die mRNAs der Chloroplasten sind vergleichsweise weniger strukturiert und vielleicht noch während der Transkription leichter zugänglich für Prozessierungsfaktoren. Nach der Transkriptionstermination dissoziieren bereits prozessierte Transkripte schneller von der Polymerase und können sofort für die Translation eingesetzt werden (Abb. 29 D). Folglich sind die mRNAs von *psbB*, *psbC/D* und *psaA/B* im Vergleich zu den tRNAs nicht mehr mit der PEP assoziiert.

(v) Alternativ könnten PEP-assoziierte tRNAs reife tRNAs repräsentieren (siehe Abb. 29 E), die die plastidäre Transkription regulieren, indem sie mit der PEP interagieren.

Die direkte Bindung der plastidär kodierten Transfer-RNAs für Glutamat und Valin sowie Glycin an die kernkodierte RNA Polymerase NEP wurden durch frühere *in vitro* Studien bestätigt (Hanaoka *et al.* 2005, Bohne *et al.* 2009). Allerdings ist eine spezifische Regulation durch die tRNAs eher unwahrscheinlich (Bohne *et al.* 2009). Außerdem spricht die Assoziation zu einzelnen tRNA Introns gegen eine Bindung der PEP zu reifen tRNAs (siehe Detailansicht in Abb. 20, S. 69). Nicht alle intronhaltigen tRNAs konnten im Detail untersucht werden, was in der geringen Auflösung des Tabakplastom überspannenden *Tiling-Microarrays* begründet ist. In Zukunft könnten *Microarrays* mit mehreren kurzen überlappenden Oligonukleotiden aller intronhaltigen tRNAs erzeugt werden (Länge ca. 50 bp, Einengung der Assoziationsstellen der PEP), um die Interaktion der PEP zu reifen bzw. ungespleißten tRNA Transkripten genauer zu charakterisieren. Des Weiteren könnten Northern Analysen der koprizipitierten RNA hilfreich sein für die Unterscheidung zwischen Vorläufer- und reifer tRNA Transkripte. Die gleichen Methoden könnten auch helfen, die Assoziation zu anderen intronhaltigen oder polycistronischen mRNAs detaillierter zu untersuchen. Ob die PEP tatsächlich mit reifen tRNAs assoziiert, könnten zukünftige *in vitro* Bindungsstudien mit allen tRNAs und RpoA:HA Extrakten zeigen. Dies könnte unter anderem einen Einblick in die Regulation der PEP-abhängigen Transkription durch reife tRNAs ermöglichen, wenn diese tatsächlich eine regulatorische Rolle übernehmen.

Zusammenfassend konnte anhand der hier erhobenen Daten, erstmals *in vivo* eine Assoziation der PEP besonders zu vielen tRNAs sowie den RNAs von *rbcL* und *psbA* gezeigt werden, sowohl auf DNA als auch auf RNA Ebene. Folgt man der Hypothese (ii), erscheint es plausibel, dass die PEP, wie auch andere RNA Polymerasen, an den bestimmten DNA Abschnitten einiger Gene eine aktive Transkription betreibt und an anderen nicht. So konnte nicht für alle gebundenen Gene ein naszierendes Transkript nachgewiesen werden, zumindest deutet dies der Vergleich der DNA und RNA Assoziation an. Dabei könnte eine aktive Transkription zum beobachteten Zeitpunkt vor allem an den tRNAs, *psbA* sowie *rbcL* stattfinden. Eine spannende Aufgabe ist es, in Zukunft andere Tageszeitpunkte, Wachstumsbedingungen oder Stresseinflüsse zu analysieren, um ein noch genaueres Bild der PEP und ihrer Funktion in der plastidären Genexpression zu erlangen. Es bleiben viele Fragen offen, aber die vorliegende Arbeit konnte einen ersten Einblick über die PEP-abhängige Transkription im Chloroplasten geben.

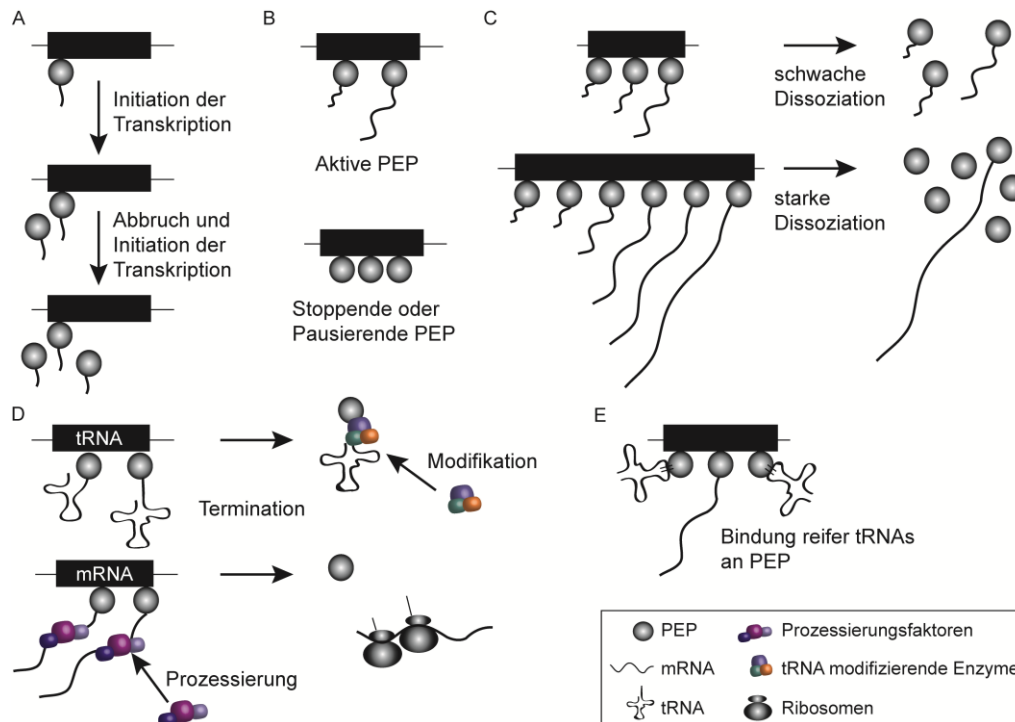


Abb. 29: Modell der PEP Assoziation mit DNA und RNA anhand der erhobenen ChIP-on-Chip und RIP-Chip Daten. (A) Illustration der Initiation und frühzeitigem Abbruch der Transkription. Die PEP transkribiert kurze RNA Fragmente und bricht die Transkription ab. Dieser Vorgang wiederholt sich mehrmals. Demzufolge ist die PEP mit der DNA und RNA assoziiert, sodass es zu einer Anreicherung in ChIP-on-Chip und RIP-Chip Analysen kommt. Kurze Fragmente können mittels RIP-Chip nicht von Vollängen Transkripten unterschieden werden. (B) Transkriptionseffektivität der PEP. Bei der aktiven PEP kann die Assoziation zur DNA und gleichzeitig auch zur zugehörigen RNA nachgewiesen werden. Kommt es zum Pausieren der PEP, kann nur die DNA Assoziation, nicht aber die RNA Assoziation bestimmt werden. (C) Unterschiedliche Dissoziation der PEP von kurzen und langen Transkripten. Die Anzahl der PEP Enzyme könnte auf langen Genen vergleichsweise größer sein als auf kurzen Genen, was in ChIP-on-Chip Analysen mit einer stärkeren Anreicherung langer Gene und einer geringen Anreicherung kurzer Gene resultiert. Ein umgekehrtes Verhältnis in RIP-Chip Analysen, bei denen kurze Transkripte stärker als lange Transkripte angereichert sind, könnte durch eine schwache Dissoziation der PEP von kurzen RNAs und einer starken Dissoziation von langen Transkripten bedingt sein. (D) Unterschiedlich starke Dissoziation der PEP von tRNAs und mRNAs nach der Transkriptionstermination in Abhängigkeit des Prozessierungszustands. Die mRNAs sind wenig strukturiert und möglicherweise noch während der Transkription zugänglich für Prozessierungsfaktoren, sodass es zu einer Kopplung von Transkription und posttranskriptionalen Prozessen kommt. Aus diesem Grund könnte die PEP nach der Termination schnell von diesen mRNAs dissoziieren und sie können direkt für die Translation eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu könnten die tRNA Modifikationen posttranskriptional erfolgen und die PEP dient als eine Art Landeplattform für tRNA modifizierende Enzyme. Aufgrund der kleeblattartigen Struktur ist die PEP nicht in der Lage von den tRNAs nach der Termination zu dissoziieren. (E) Reife tRNAs binden an die PEP und könnten eine Rolle bei der Regulation der Transkription spielen.

4.3.4 Besondere Bedeutung der PEP für die Expression plastidärer tRNAs

Die PEP ist mit weiteren Proteinen assoziiert, die sehr wahrscheinlich einen Einfluss auf die PEP Aktivität haben (Steiner *et al.* 2011). In den meisten Fällen führte ein Fehlen dieser Proteine *in vivo* zu einer gestörten PEP-vermittelten Transkription (Pfalz *et al.* 2006, Garcia *et al.* 2008, Myouga *et al.* 2008, Arsova *et al.* 2010, Gao *et al.* 2011, Steiner *et al.* 2011, Gao *et al.* 2012, Jeon *et al.* 2012, Yagi *et al.* 2012). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Mutanten PEP-assoziiierter Proteine (*ptac2*, *ptac12*, *ptac10*, *prin2* und *murE*) in Mais besonders schwerwiegende Defekte in der Akkumulation von einigen tRNAs haben (Williams-Carrier *et al.* 2013). Demnach scheinen die PEP-assoziierten Proteine und die PEP selbst eine besonders wichtige Rolle bei der Transkription plastidärer tRNAs zu spielen (Williams-Carrier *et al.* 2013). So zeigten *Macroarray* Untersuchungen in Tabak *rpoA Knockouts*, dass die PEP einen starken Einfluss auf die tRNA Expression hat (Legen, Kemp, Krause, Profanter, Herrmann und Maier 2002). Bei der Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte der tRNAs *trnL(UAA)*, *trnS(UGA)*, *trnQ(UUG)*, *trnM(CAU)*, *trnN(GUU)* und *trnT* konnten PEP Promotoren, aber keine NEP Promotoren identifiziert werden (Zhelyazkova *et al.* 2012). Diese Beobachtungen stehen mit den hier gezeigten ChIP-on-Chip und RIP-Chip Analysen im Einklang. Die Gene der tRNAs *trnG(UCC)*, *trnD/Y/E*, *trnL(UAA)*, *trnV(UAC)-trnM(CAU)*, *trnI(GAU)* sowie *trnA(UGC)* sind mit der PEP assoziiert und die zugehörigen RNAs zeigten eine starke Anreicherung in RpoA:HA Immunopräzipitationen. Das bedeutet die PEP interagiert nicht nur mit den DNA Regionen verschiedener tRNAs, sondern betreibt hier möglicherweise aktiv Transkription. Neben der hier untersuchten PEP Kernuntereinheit RpoA scheinen auch andere PEP-assoziierte Faktoren die Expression von plastidären tRNAs zu beeinflussen. Dazu zählen unter anderem die Sigmafaktoren SIG2 und SIG6 (Kanamaru *et al.* 2001, Ishizaki *et al.* 2005) sowie das PEP-assoziierte Protein pTAC3 (Yagi *et al.* 2012). Die Reduktion vieler tRNAs in Mutanten PEP-assoziiierter Proteine (Williams-Carrier *et al.* 2013) und die hier gezeigten Ergebnisse liefern den Beweis, dass die Transkription vieler plastidärer tRNAs stark abhängig von der PEP und ihren assoziierten Proteinen ist.

4.3.4.1 Ist der Phänotyp von PEP Nullmutanten eine Folge reduzierter Translation?

Die Inaktivierung der PEP Kernuntereinheiten oder PEP-assoziiierter Proteine resultiert meist in albinotischen oder chlorotischen Phänotypen und die plastidäre Genexpression unterliegt einer starken Reduktion PEP-abhängiger Transkripte (Zusammenfassung aller bisher beschriebenen Nullmutanten des PEP Komplexes in Pfalz und Pfannschmidt 2013). Darüber hinaus zeigten frühere Studien, dass der Verlust der PEP zur Reduktion plastidärer Ribosomen und plastidär kodierter Proteine führt (z.B. in Williams-Carrier *et al.* 2013). Diese globale Proteindefizienz ist normalerweise typisch für Mutanten mit einer defekten Biogenese der plastidären Translationsmaschinerie (Barkan 1993). Die Transkription der *rpo* Gene, wird zwar primär durch die kernkodierte RNA Polymerase NEP vermittelt (Demarsy *et al.* 2006, Demarsy *et al.* 2012), aber für die Proteinbiosynthese der PEP Untereinheiten ist ein funktionierender Translationsapparat essentiell, zu dem unter anderem die tRNAs gehören (Williams-Carrier *et al.* 2013). Die Chloroplasten der höheren Pflanzen enthalten 30 tRNA Gene für alle Aminosäuren, von denen einige essentiell für die plastidäre Translation sind (Shinozaki *et al.* 1986, Sato *et al.* 1999b, Alkatib *et al.* 2012). Demnach wäre folgendes Szenario vorstellbar: Aufgrund der Inaktivierung einer der (Kern)-Komponenten der PEP können im Chloroplasten keine tRNAs transkribiert werden. Bisher deutet nichts darauf hin, dass funktionelle cytosolische tRNAs in Plastiden transportiert werden und ein Fehlen plastidärer tRNAs durch kernkodierte tRNAs kompensiert wird (Kanamaru *et al.* 2001, Legen *et al.* 2007). Einige tRNAs weisen keine NEP Promotoren auf (Zhelyazkova *et al.* 2012) und können nicht durch die kernkodierte NEP komplettiert werden. Infolgedessen könnte ein Defizit plastidärer tRNAs bei der Reduktion plastidärer Ribosomen mitwirken, indem die Synthese von ribosomalen Proteinen in Plastiden gestört ist (Williams-Carrier *et al.* 2013). Allerdings bleibt eine restliche Translationsaktivität erhalten (De Santis-Maciossek *et al.* 1999). So konnte beispielsweise das Genprodukt des plastidären *rp12* Gens zwar in *rpo*-defizienten Plastiden nachgewiesen werden, zeigte aber eine Reduktion auf Proteinebene (De Santis-Maciossek *et al.* 1999). Dennoch könnte dies zu einer Beeinträchtigung der Translationsmaschinerie in den Nullmutanten der PEP und PEP-assoziierten Proteine führen und die globalen Defekte auf makroskopischer sowie molekularer Ebene hervorrufen.

4.3.4.2 Frühe Akkumulation der PEP in der Tabakentwicklung

Die oben beschriebenen Beobachtungen deuten an, dass eine basale Menge der PEP in allen Zellen aufrechterhalten werden muss, die sich zu photosynthetischem Gewebe differenzieren (Williams-Carrier *et al.* 2013). Frühere Publikationen zeigten, dass die PEP bereits in den Samen verschiedener dikotylen Pflanzenspezies vorkommt (Demarsy *et al.* 2006, Demarsy *et al.* 2012). Das rekombinante RpoA:HA war zwar nicht in trockenen Samen der Tabakpflanze nachweisbar, aber bereits drei Tage nach Imbibition und über den beobachteten Zeitraum von 59 Tagen nahezu konstant exprimiert (s. Abb. 8, S. 49). Hinzu kommt, dass in etiolierten Tabakpflanzen RpoA:HA akkumuliert (s. Abb. 9, S. 51). Diese Ergebnisse gehen mit den Beobachtungen von Demarsy *et al.* (2006) einher, dass die PEP in nicht-photosynthetischem Gewebe bereits aktiv ist und eine wichtige Rolle in der frühen Chloroplastenentwicklung spielt. Eventuell könnte das Vorkommen der PEP in nicht-photosynthetischen Gewebe einen Anstieg limitierender tRNAs fördern und dadurch die Synthese der PEP an plastidären Ribosomen beschleunigen (Williams-Carrier *et al.* 2013). Um einen tieferen Einblick in die Transkriptionsaktivität der PEP während der frühen Entwicklung von Chloroplasten zu bekommen, wären ChIP-on-Chip und RIP-Chip Analysen in Etioplasten hilfreich. Damit könnte geklärt werden, ob die PEP noch vor der Transition vom Etioplast zum Chloroplast für die Transkription von tRNA Genen verantwortlich ist.

4.4 Membrananker für die PEP

In reifen Chloroplasten konnte für zwei der phagenähnlichen RNA Polymerasen (*RpoTp*, *RpoTnp*) eine Assoziation mit Chloroplastenmembranen in Spinat gezeigt werden (Azevedo *et al.* 2006). Die DNA spielt dabei keine wichtige Rolle bei der Verankerung beider Transkriptionsenzyme (Azevedo *et al.* 2006). Vielmehr konnte in *Arabidopsis* als Reaktion auf Lichtsignale die Thylakoidmembranbindung der *RpoTnp* durch ein RING-Finger Protein nachgewiesen werden (Azevedo *et al.* 2008). Obwohl für die PEP eine Membranassoziation schon seit langem bekannt ist (Reiss und Link 1985), konnte ein ähnliches lichtreguliertes Befestigungsprotein bisher nicht identifiziert werden. PEP Untereinheiten wurden in Präparationen von Nukleoiden und auch im TAC detektiert (Suck *et al.* 1996, Pfalz *et al.* 2006, Steiner *et*

al. 2011, Majeran *et al.* 2012) - sowohl TAC als auch Nukleotide zeigen Assoziation mit Membranen (Miyamura *et al.* 1986, Liu und Rose 1992, Sato *et al.* 1993, Sato *et al.* 1999b). Zumindest die Lokalisation der Nukleotide ist dynamisch und hängt, vermittelt von verschiedenen Ankerproteinen sowie Entwicklungs- und Umwelteinflüssen ab (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Ob die PEP passiv der Lokalisation der Nukleotide folgt, war bisher unklar. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass mehr als 95% der PEP membrangebunden sind und nur ein kleiner Anteil im Stroma vorliegt (siehe Abb. 10, S. 52). Interessanterweise hat Licht scheinbar keinen Einfluss auf die Verteilung des Proteins im Chloroplasten. Diese Membranassoziation ist zumindest in jungem Gewebe nicht allein DNA-vermittelt (siehe Abb. 11, S. 54). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es einen permanenten nicht DNA-kontrollierten Anker gibt, der die PEP an der Membran unabhängig von den Lichteinflüssen befestigt. Allerdings wird diese Situation verkompliziert durch die Tatsache, dass die PEP in altem Gewebe der Tabakpflanzen teilweise von der Membran durch die Restriktion der DNA losgelöst werden kann (s. Abb.11, S. 54). Möglicherweise verändert sich die Verankerung der PEP mit Membranen entwicklungsabhängig. In jungem Gewebe erfolgt die Anheftung über ein nicht-DNA kontrolliertes Ankerprotein wohingegen sie in reifen Chloroplasten DNA-vermittelt ist.

Da die PEP mit vielen akzessorischen Proteinen in Nukleoiden und TACs assoziiert (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012, Pfalz und Pfannschmidt 2013), liegt die Vermutung nahe, dass die Verankerung der PEP an die Membran über diese Proteine erfolgt. Die Ankerproteine PEND und MFP1 sind geeignete Kandidaten, die eine Funktion in der Befestigung der PEP an die Membran übernehmen könnten. Das PEND Protein ist ein Mitglied der bZIP Proteinfamilie und assoziiert mit der inneren Hüllmembran der Chloroplasten zum gleichen Zeitpunkt, wenn Nukleotide mit dieser kolokalisieren (Sato *et al.* 1993, Sato *et al.* 1998, Sato *et al.* 1999a). MFP1 gehört zu den doppelwendigen (*coiled-coil*) Proteinen mit einer C-terminalen DNA-bindenden Domäne und assoziiert *in vivo* mit den Nukleoiden (Jeong *et al.* 2003). Ein weiteres Protein mit Interaktionen zum Nukleoid ist pTAC16, für das auch eine Funktion bei der Membranverankerung vorgeschlagen wurde (Majeran *et al.* 2012). Es bleibt spannend zu klären, ob die PEP ähnlich wie die NEP durch bestimmte Membrananker befestigt wird (Azevedo *et al.* 2008), oder ob sie über einen anderen Mechanismus gebunden wird.

Der Grund für eine Verankerung der Nukleotide und damit auch der PEP an die Chloroplastenmembranen ist noch nicht geklärt, aber möglicherweise kann dadurch die Insertion von plastidär kodierten Membranproteinen erleichtert werden (Majeran *et al.* 2012). Es bleibt spannend zu testen, ob diese generellen DNA-bindenden Proteine direkt mit der PEP interagieren oder ob sie nur passiv bei der Verankerung der PEP über die DNA an Chloroplastenmembranen helfen.

4.5 Kopplung Transkription und posttranskriptionaler Prozesse

In Chloroplasten existieren bisher nur sehr wenige Daten über eine mögliche Kopplung der Transkription mit stromabwärts gelegenen Ereignissen wie der RNA Prozessierung und der Translation. Die bakterielle Transkription und Translation sind miteinander gekoppelt. Dabei initiieren die Ribosomen die Translation noch während der RNA Synthese (Gowrishankar und Harinarayanan 2004, Burmann *et al.* 2010, Proshkin *et al.* 2010). Plastiden (Chloroplasten) entwickelten sich einst aus prokaryotischen Vorfahren durch Endosymbiose. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die Transkription und posttranskriptionale Prozesse ähnlich miteinander verknüpft sind, wie es für Bakterien bekannt ist.

Inwieweit eine solche Verbindung besteht, wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Transkriptanalysen in hochaufgereinigten TAC-Komplexen untersucht. Dafür wurden erstmals TAC-assoziierte RNAs basierend auf *Microarray* Untersuchungen auf plastomweiter Ebene identifiziert (siehe Abb. 24, S. 76) und deren Prozessierungsstatus mittels Northern- und Edierungsanalysen (s. Abb. 26, S. 80 und Abb. 28, S. 84) charakterisiert.

4.5.1 Viele plastidäre RNAs assoziieren mit dem TAC

Fast alle plastidären RNAs, unabhängig durch welche RNA Polymerase (PEP oder NEP) sie transkribiert werden, sind mit dem TAC assoziiert (siehe Abb. 24, S. 76). Obwohl die TACII-Fraktion einen höher aufgereinigten TAC-Komplex verglichen zu TACI repräsentiert, zeigte der Vergleich TACI- und TACII-assoziiierter RNA fast keinen Unterschied. Insgesamt betrachtet, unterscheiden sich die TAC-Präparationen zwar in ihrer Proteinkomposition und -anreicherung (Krause und Krupinska 2000, Melonek *et al.* 2012), aber die Assoziation mit plastidären Transkripten ändert sich fast nicht

auf plastomweiter Ebene. Das spricht für eine starke Interaktion des TAC und seinen assoziierten RNAs. Ungefähr 80% der gesamten plastidären RNAs sind im TAC zu finden. Zu den am stärksten angereicherten RNAs gehören Vertreter verschiedener Protein-kodierender RNAs, z.B. *matK*, *psaA/B*, *ndhA*/ *I*/ *G*, *rpoB*/ *C1*/ *C2* und *ycf2*. Neben diesen Transkripten konnte auch eine Anreicherung für RNAs ribosomaler Proteine (*rps2*, *rps4*, *rpl20*, *rps8* etc.) sowie einiger tRNAs (*trnK*(UUU), *trnI*(GAU), *trnA*(UGC), *trnS*(GGA) und *trnG*(UCC)) detektiert werden. Das bedeutet, dass im TAC RNAs fast aller Funktionsklassen zu finden sind.

Sehr überraschend war die Beobachtung, dass abundante RNAs wie *psbA*, *rbcL* und auch die ribosomalen RNAs (*rrn16*, *rrn23*, *rrn4,5*, *rrn5*) nicht mit dem TAC-Komplex zu assoziieren scheinen (Abb. 24, S. 76). Wie kommt es zu dieser geringen Anreicherung gerade der abundantesten RNAs im TAC? Von den Ribosomen sind bisher nur wenige Bestandteile in den membranständigen TAC-Fraktionen identifiziert worden. Dazu zählen die ribosomalen Proteine L12-1, S3 und L29 sowie S5 als einzige Vertreter (Pfalz *et al.* 2006, Melonek *et al.* 2012). Viele plastidäre Ribosomen assoziieren wie der TAC-Komplex mit den Thylakoidmembranen der Chloroplasten (Peled-Zehavi und Danon 2007). Allerdings ist nicht bekannt, ob die Biogenese der Ribosomen an den Thylakoiden (Fristedt *et al.* 2014) und damit in unmittelbarer Nähe des TACs stattfindet. Die Assemblierung der Ribosomen erfolgt möglicherweise an einem anderen Ort, sodass die rRNAs aus dem TAC dissoziieren und hier nicht mehr nachweisbar sind.

Wie unter Kap. 4.3.2 bereits beschrieben zeigt das Genprodukt der *psbA* mRNA hohe Umsatzraten im Chloroplasten, um die Funktionalität des PSII aufrechtzuerhalten (Klein und Mullet 1987, Pokorska *et al.* 2009, Link *et al.* 2012). Dabei wird degradiertes D1 Protein kotranslationell durch eine neue Kopie ersetzt (Pokorska *et al.* 2009, Link *et al.* 2012). Demnach könnte die Syntheserate des D1 Proteins durch eine schnelle Translation der *psbA* mRNA an den Ribosomen gekennzeichnet sein. Für die Präparation des TAC-Komplexes wurden Tabakpflanzen am Tag, das heißt nach kurzer Belichtung, geerntet. Frühere Untersuchungen zeigten, dass dies bereits zur Translation des Genprodukts führt und *psbA* hauptsächlich in Polysomen lokalisiert (Klein und Mullet 1987, Klein *et al.* 1988). Es ist also wahrscheinlich, dass *psbA* mit den Ribosomen assoziiert und vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation von TAC und Ribosomen nicht in den TAC-Fraktionen gefunden werden kann.

Die *rbcL* mRNA kodiert für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (RuBisCo), welches im Stroma der Chloroplasten lokalisiert (Ellis 1979). Die Mehrheit der *rbcL* mRNA konnte in der Stromafraktion der Chloroplasten detektiert werden (Klein *et al.* 1988). Überdies assoziiert *rbcL* nach der Belichtung fast ausschließlich in großen stromalen Polysomenfraktionen (Klein *et al.* 1988). Somit scheint die Assoziation der *rbcL* mRNA mit dem membranständigen TAC eher unwahrscheinlich zu sein.

Die funktionelle Bedeutung der RNA Assoziation im TAC ist momentan unklar. Die einfachste Erklärung wäre, dass es sich um naszierende RNAs handelt, die im TAC zu reifen Transkripten heranreifen. So könnte der TAC nicht nur Ort der RNA Synthese, sondern auch der RNA Prozessierung sein. Ein Zusammenspiel von Transkription und posttranskriptionalen Prozessen wäre denkbar. Tatsächlich können viele Komponenten beider Vorgänge im Kern des Nukleoids (Majeran *et al.* 2012) und sogar im TAC (Pfalz *et al.* 2006, Melonek *et al.* 2012, Pfalz und Pfannschmidt 2013, Krupinska *et al.* 2013) identifiziert werden. Neben den Kernuntereinheiten der PEP gehören Mitglieder der PPR-Proteinfamilie und der cpRNP Familie zum TAC (CP29B und CP31A, Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012). Für beide Proteinklassen wurde unter anderem eine Beteiligung in der organellären RNA Prozessierung und Translation postuliert (Schmitz-Linneweber und Small 2008, Ruwe *et al.* 2011). Die räumliche Nähe der PEP zu den PPRs sowie cpRNPs könnte auf einen engen Kontakt zwischen Transkription und posttranskriptionaler Prozesse hinweisen. Weitere Befunde sind notwendig, die die Hypothese der kotranskriptionellen Kopplung zwischen Transkription und mRNA Prozessierung innerhalb des TACs unterstützen. Transkriptanalysen TAC-assoziiierter RNAs könnten dabei erste Einblicke zum Prozessierungszustand einzelner RNAs liefern (siehe Kap.4.5.2). Inwiefern die hier beobachteten TAC RNAs mit den Proteinfaktoren des RNA Metabolismus und der PEP in Verbindung stehen, bleibt eine spannende Frage.

4.5.2 Der TAC-Komplex enthält prozessierte RNA

4.5.2.1 RNAs des TACs sind bereits gespleißt

Für einige RNAs des TAC-Komplexes konnte das gesamte Operon polycistronischer Transkripte nachgewiesen werden. Das heißt, die kodierende Sequenz eines Operons ist stärker angereichert als benachbarte nicht-kodierende Sequenzen (z.B.

psbB Operon, *atpI* Operon, *psbC/D*, *psaA/B*, *ndhH* Operon, *rpoB* Operon, siehe Abb. 24, S. 76, Abb. 25, S. 77). Allerdings kann anhand der erhobenen Daten nicht zwischen den Transkriptvorläufern und reifen Transkripten unterschieden werden.

Erste Hinweise über prozessierte mRNA Moleküle im TAC konnten dennoch aus den *Microarray* Analysen abgelesen werden. Einige Intronbereiche einzelner mRNAs lagen reduziert vor (z.B. Intron von *rpoC1*, Intron von *atpF*, Abb. 25, S. 77). Eine Einschränkung der genauen Untersuchung der Intron-Exon-Grenze anderer RNAs ergibt sich aus der begrenzten Auflösung des *Microarrays* (PCR-Produkte mit einer durchschnittlichen Länge von ~700 bp). So können reife und unprozessierte Transkripte gleichermaßen mit PCR-Sonden des *Microarrays* hybridisieren, die gleichzeitig Exon- und Intronsequenzen aufweisen, und sind nicht voneinander zu unterscheiden. Um die mRNA Reifungsprozesse innerhalb des TACs näher zu charakterisieren, wurde der Spleißstatus und die Edierungseffizienz ausgewählter Transkripte untersucht. Dies ermöglichte erstmals einen Einblick in den Prozessierungszustand TAC-assoziiierter Transkripte.

Obwohl die TAC-Extraktion ein langer biochemischer Prozess ist (Melonek *et al.* 2012), bleiben die RNA Moleküle nahezu intakt und liegen nicht degradiert vor (s. *psbD* Transkripte in Abb. 26, S. 80). Die Entdeckung polycistronischer Vorläufer von *atpF* mit und ohne Intron (s. Abb. 26, S. 80), sowie das Vorhandensein des gespleißten *atpF* Transkripts (s. Abb. 27, S. 82), bestärkt die Vermutung, dass im TAC eine Mischung aus nicht-prozessierten Vorläufer-Molekülen und reifen Transkripten existiert. Die für Northern Analysen eingesetzte RNA Menge aus dem TACII war zu gering, um hier erfolgreich die Transkripte von *psbC-psbD* und *atpF* nachzuweisen. Im Gegensatz dazu sind *Microarray* Analysen sensitiver und können RNA Mengen im Pikogrammbereich detektieren. Die Existenz von RNA Prozessierungsfaktoren im Kern plastidärer Nukleole (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012) und die hier gezeigten Ergebnisse, legen die Vermutung nahe, dass TAC-assoziierte RNA Moleküle noch innerhalb des TACs gespleißt werden und dieser Prozess eventuell kotranskriptionell stattfindet. Tatsächlich konnte der Spleißfaktor CRS1 von *atpF* (Ostersetzer *et al.* 2005, Till *et al.* 2001) in den Nukleoiden von Mais nachgewiesen werden (Majeran *et al.* 2012). Andere Faktoren die eine Beteiligung am Spleißvorgang haben, wie PPR5 (Beick *et al.* 2008), CRS2-CAF2 (Ostheimer *et al.* 2003, Ostheimer *et al.* 2006) oder APO1 (Watkins *et al.* 2011), sind im Nukleoid assoziiert (Majeran *et al.* 2012) und damit in

unmittelbarer Nähe zum TAC-Komplex. Inwieweit die Nukleoid- oder TAC-Assoziation dieser Faktoren mit dem Prozessierungszustand verschiedener Transkripte im TAC korreliert, muss künftig durch die parallele Analyse von RNAs und den jeweils dazugehörigen Prozessierungsfaktor überprüft werden.

4.5.2.2 Einige Transkripte liegen bereits ediert im TAC vor

Neben dem Spleißen spielt die RNA Edierung eine weitere wichtige Rolle bei der Reifung von mRNAs im Chloroplasten. Ob es auch einen Zusammenhang zwischen TAC-assoziierten Transkripten und der Edierung gibt, wurde anhand drei ausgewählter Transkripte analysiert. In Tabak gibt es 31 Edierungsstellen, von denen vier partiell ediert werden (2. Edierungsstelle in *atpA*, 1. Stelle in *ndhD*, 2. Stelle in *rps14* und *rpoA*), was in zwei verschiedenen mRNA Formen resultiert (Hirose *et al.* 1999). Die C → U Edierungseffizienz gibt dabei den Fortschritt der Edierung an (Tillich *et al.* 2006). Vier der fünf Edierungsstellen der hier untersuchten Transkripte liegen bereits ediert und damit prozessiert im TAC vor (s. Abb. 28, S. 84). Nur die Edierungseffizienz der partiell edierten Stelle von *ndhD* unterscheidet sich deutlich zwischen TAC-assoziiierter RNA und plastidärer Gesamt-RNA. Zudem spricht dieser Befund gegen eine passive Kontamination der TAC-Fraktion mit plastidärer RNA. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, dass die Prozessierung sehr wahrscheinlich schon im TAC stattfindet, aber nicht alle Transkripte im Kern des chloroplastidären Nukleoids heranreifen. Der erste in Pflanzen entdeckte Edierungsfaktor war CRR4 (CHLORORESPIRATORY REDUCTION 4, Kotera *et al.* 2005) und in der Arbeit von Okuda *et al.* (2006) wurde er als Erkennungsfaktor der *ndhD* Edierungsstelle vorgeschlagen. 2012 zeigten Boussardon und Kollegen eine Interaktion zwischen CRR4 und DYW-1, die sehr wahrscheinlich zusammen bei der Edierung von *ndhDeU2TM* beteiligt sind (Okuda *et al.* 2006, Boussardon *et al.* 2012). Die Tatsache, dass *ndhD* nicht im TAC ediert vorliegt und beide Proteinfaktoren bisher nicht in den Nukleidaufreinigungen bzw. TAC-Präparationen gefunden wurden (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012), deutet an, dass das Edierungsereignis von *ndhD* nicht mit dem TAC assoziiert ist, sondern eventuell in der peripheren Umgebung dieser stattfindet. Ob es eine Korrelation zwischen Prozessierungsereignissen und dem Vorkommen des zugehörigen Proteinfaktors im TAC gibt, bleibt eine spannende Frage. Bisher konnten nur die beiden

Edierungsfaktoren CRR22 und CRR28 (Okuda *et al.* 2009) in den Nukleoiden identifiziert werden (Majeran *et al.* 2012). Neben diesen befinden sich eine Vielzahl von (PPR)-Proteinen mit unbekannter Funktion (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012). Für *atpA* ist bisher kein Edierungsfaktor bestimmt worden. Die unbekannten PPR-Proteine könnten eine spezifische Funktion bei der Edierung von *atpA* und *rps14* im TAC übernehmen. Für die Edierung von *rps14eU80SL* ist zwar das PPR-Protein OTP86 verantwortlich (Hammani *et al.* 2009), das jedoch noch nicht im TAC bestätigt werden konnte. Außerdem ist die tatsächliche Proteinkomposition der plastidären Nukleole noch immer stark umstritten (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Denn Nukleole sind sehr flexible DNA-RNA-Protein-Komplexe, die stark in ihrer Proteinkomposition variieren können (Sato *et al.* 2003, Pfalz und Pfannschmidt 2013). Demnach ist es schwierig zwischen festen, transienten oder kontaminierenden Proteinbestandteilen zu unterscheiden (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Hinzu kommt, dass die hier gezeigten Spleiß- und Edierungsanalysen nur einen winzigen Ausschnitt chloroplastidärer RNAs umfassen. Um einen tieferen Einblick in TAC- oder Nukleoid-gekoppelte Prozesse zu erlangen, müssen in Zukunft weitere Reifungsprozesse TAC-assoziiierter Transkripte sowie die genaue Proteinkomposition des Nukleoids bzw. TACs untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass anhand der hier gezeigten Transkriptanalysen und früherer proteomischer Daten TAC-assoziiierter Proteine eine Kopplung zwischen Transkription und stromabwärts gelegenen Ereignissen wie dem Spleißen, der Edierung, 5'- und 3'-Prozessierung sowie der Translation im Nukleoid möglich erscheint. Wie in ihren bakteriellen Vorfahren könnten die einzelnen Prozesse im Chloroplasten nicht räumlich getrennt sein. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diesen Zusammenhang zu verifizieren. Sehr wahrscheinlich gibt es im Nukleoid sogenannte Subdomänen, die je nach Proteinkomposition an einem der oben genannten Prozesse beteiligt sein können (Pfalz und Pfannschmidt 2013). Vielleicht wird die Kinetik einzelner Prozesse, also ob sie kotranskriptionell oder posttranskriptionell stattfinden, durch die dynamische Veränderung des Nukleoids bestimmt.

4.6 Funktionsverlust von *rps2* durch Epitopmarkierungen

Die Entdeckung von ribosomalen Proteinen und Translationsfaktoren in TACs oder Nukleoiden (Pfalz *et al.* 2006, Majeran *et al.* 2012, Melonek *et al.* 2012) und damit die räumliche Nähe zur PEP lässt auch eine kotranskriptionelle Translation möglich erscheinen. Zur Aufklärung dieses Sachverhalts wurden zusammen mit der Masterstudentin Denise Czepluch transplastomische Pflanzen erzeugt, die jeweils ein Protein der Transkriptionsmaschinerie (PEP Untereinheit RpoC2) und ein Protein der Translationsmaschinerie (ribosomales Protein S2) mit unterschiedlichen Epitopmarkierungen in ein und derselben Pflanze enthalten (siehe Abb. 21, S. 71). Unter allen transplastomischen Linien wurden aber bislang keine homoplastomischen Pflanzen identifiziert. Ein längerer Selektionsdruck unter Spectinomycin-haltigem Medium könnte die verbleibenden Plastomkopien des WT eliminieren (Svab und Maliga 1993), was noch zu prüfen wäre. Sollte dies nicht gelingen, ist die Epitopmarkierung von RpoC2 und Rps2 nicht möglich. Das Ausschalten essentieller Bestandteile des Translationsapparats resultiert meist in der Heteroplastomie (Ahlert *et al.* 2003, Rogalski *et al.* 2006, Legen *et al.* 2007). Damit unter Anwesenheit eines Selektionsantibiotikums die Zellen lebensfähig bleiben, werden das WT und mutante Plastom beibehalten (Ahlert *et al.* 2003, Rogalski *et al.* 2006). Interessanterweise zeigten die Pflanzen der Kalluslinien einen Phänotyp, nachdem sie auf Erde umgesetzt wurden (s. Abb. 22, S. 72). Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Phänotyps wurden in transplastomischen Pflanzen mit einem Nullallel von *rps2* gezeigt (Rogalski *et al.* 2008b). Diese Deformationen sind typisch für *Knockout* Transformanten essentieller Gene und deutet auf eine eingeschränkte Zellentwicklung durch die Beeinträchtigung der plastidären Genexpression hin (Drescher *et al.* 2000, Rogalski *et al.* 2006, Rogalski *et al.* 2008b, Fleischmann *et al.* 2011). Ohne den Selektionsdruck sterben transplastomische Zellen und das resultiert meist im Verlust größerer Blattsegmente (Drescher *et al.* 2000). Diese Ergebnisse sprechen für den Funktionsverlust von *rps2*. Da die Kontrollpflanzen (enthalten nur *aadA*) einen ähnlichen Phänotyp zeigten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Selektionsmarker selbst für die Beeinträchtigung der *rps2* Funktion verantwortlich ist. Die Position der Kasette könnte zu einer gestörten *rps2* Genexpression führen. Dieser Sachverhalt ließe sich durch Transkriptakkumulation von *rps2* und durch

Ribosomenassoziation in transplastomischen Pflanzen gegenüber WT Pflanzen überprüfen.

4.7 Ausblick

Eine Kopplung der Transkription und der posttranskriptionellen Prozessierung scheint in den Chloroplasten nicht ausgeschlossen zu sein. Diese Annahme wird unterstützt durch den Fund der PEP zusammen mit vielen Prozessierungsfaktoren, wie die PPR-Proteine oder cpRNPs, in einem großen Multienzymkomplex. Hinzu kommt, dass viele RNAs innerhalb dieses Komplexes prozessiert vorliegen. Es ist jedoch unklar wie ein solches Zusammenspiel im Chloroplasten aussieht. Chloroplasten heutiger Pflanzenzellen sind ein Überbleibsel ihrer prokaryotischen Vorfahren, sodass die Vermutung nahe liegt, dass die Transkriptions- und Translationsmaschinerie ähnlich miteinander gekoppelt werden, wie es für Bakterien bekannt ist. Es wurden weitere Werkzeuge entwickelt, um dieses Geheimnis zu lüften. In Zusammenarbeit mit der Diplomstudentin Anne Giese konnten für *rps15*, ein nicht essentielles Gen des Translationsapparats (Fleischmann *et al.* 2011), erfolgreich homoplastomische Linien mit einer N-terminalen HA-Markierung generiert werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte aus Kreuzungen einer transgenen Tabaklinien mit einem GFP (*green fluorescent protein*)-Fusionsprotein des kernkodierten und chloroplastidär lokalisierten ribosomalen Proteins L12 (freundlicherweise von Dr. Lars Scharff und Prof. Dr. Ralph Bock (MPI-Golm) zur Verfügung gestellt) und der in dieser Arbeit gezeigten RpoA:HA Linien mit Erfolg Doppelmutanten generiert werden. Diese tragen gleichzeitig eine Markierung der PEP (HA-Tag) und der Ribosomen (GFP-Tag). Die Untersuchung dieser Pflanzen könnte in Zukunft Aufschluss über z.B. überlappende Sets von mRNAs zwischen PEP und Ribosomen geben, die mittels RIP-Chip oder RIP-Seq Analysen detektiert werden. Überdies kann durch z.B. Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden, wie die räumliche Beziehung zwischen beiden Genexpressionsmaschinerien im Chloroplasten aussieht. Vielleicht gibt es eine Kolo-kalisation in der näheren Umgebung bzw. im Nukleoid. Die vorliegende Arbeit konnte einen ersten Einblick in die Kopplung zwischen Transkription und posttranskriptioneller Prozesse verschaffen, allerdings bleiben viele Fragen offen und können möglicherweise durch Verwendung der neuen Werkzeuge geklärt werden.

Literatur

- Ahlert, D., Ruf, S. und Bock, R. (2003) Plastid protein synthesis is required for plant development in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15730-15735.
- Alkatib, S., Scharff, L.B., Rogalski, M., Fleischmann, T.T., Matthes, A., Seeger, S., Schottler, M.A., Ruf, S. und Bock, R. (2012) The contributions of wobbling and superwobbling to the reading of the genetic code. *PLoS genetics*, 8, e1003076.
- Allison, L.A. (2000) The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82, 537-548.
- Allison, L.A., Simon, L.D. und Maliga, P. (1996) Deletion of *rpoB* reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants. *The EMBO journal*, 15, 2802-2809.
- Aparicio, O., Geisberg, J.V. und Struhl, K. (2004) Chromatin immunoprecipitation for determining the association of proteins with specific genomic sequences in vivo. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, Chapter 17, Unit 17 17.
- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. und Bornke, F. (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *The Plant cell*, 22, 1498-1515.
- Azevedo, J., Courtois, F., Hakimi, M.A., Demarsy, E., Lagrange, T., Alcaraz, J.P., Jaiswal, P., Marechal-Drouard, L. und Lerbs-Mache, S. (2008) Intraplastidial trafficking of a phage-type RNA polymerase is mediated by a thylakoid RING-H2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 9123-9128.
- Azevedo, J., Courtois, F. und Lerbs-Mache, S. (2006) Sub-plastidial localization of two different phage-type RNA polymerases in spinach chloroplasts. *Nucleic acids research*, 34, 436-444.
- Baba, K., Schmidt, J., Espinosa-Ruiz, A., Villarejo, A., Shiina, T., Gardestrom, P., Sane, A.P. und Bhalerao, R.P. (2004) Organellar gene transcription and early seedling development are affected in the *rpoT*;2 mutant of Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 38, 38-48.
- Baena-Gonzalez, E., Baginsky, S., Mulo, P., Summer, H., Aro, E.M. und Link, G. (2001) Chloroplast transcription at different light intensities. Glutathione-mediated phosphorylation of the major RNA polymerase involved in redox-regulated organellar gene expression. *Plant physiology*, 127, 1044-1052.

- Baginsky, S., Siddique, A. und Gruissem, W. (2004) Proteome analysis of tobacco bright yellow-2 (BY-2) cell culture plastids as a model for undifferentiated heterotrophic plastids. *Journal of proteome research*, 3, 1128-1137.
- Baginsky, S., Tiller, K. und Link, G. (1997) Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant molecular biology*, 34, 181-189.
- Baginsky, S., Tiller, K., Pfannschmidt, T. und Link, G. (1999) PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant molecular biology*, 39, 1013-1023.
- Barkan, A. (1988) Proteins encoded by a complex chloroplast transcription unit are each translated from both monocistronic and polycistronic mRNAs. *The EMBO journal*, 7, 2637-2644.
- Barkan, A. (1993) Nuclear Mutants of Maize with Defects in Chloroplast Polysome Assembly Have Altered Chloroplast RNA Metabolism. *The Plant cell*, 5, 389-402.
- Barkan, A. (1998) Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants. *Methods Enzymol.*, 297, 38-57.
- Barkan, A. (2011) Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold. *Plant physiology*, 155, 1520-1532.
- Barkan, A. und Goldschmidt-Clermont, M. (2000) Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression. *Biochimie*, 82, 559-572.
- Barkan, A., Walker, M., Nolasco, M. und Johnson, D. (1994) A nuclear mutation in maize blocks the processing and translation of several chloroplast mRNAs and provides evidence for the differential translation of alternative mRNA forms. *The EMBO journal*, 13, 3170-3181.
- Barsan, C., Sanchez-Bel, P., Rombaldi, C., Egea, I., Rossignol, M., Kuntz, M., Zouine, M., Latche, A., Bouzayen, M. und Pech, J.C. (2010) Characteristics of the tomato chromoplast revealed by proteomic analysis. *Journal of experimental botany*, 61, 2413-2431.
- Baumgartner, B.J., Rapp, J.C. und Mullet, J.E. (1993) Plastid genes encoding the transcription/translation apparatus are differentially transcribed early in barley chloroplast development. *Plant Physiol.*, 101, 781-791.
- Beick, S., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Jensen, B. und Barkan, A. (2008) The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Molecular and cellular biology*.

- Beligni, M.V., Yamaguchi, K. und Mayfield, S.P. (2004) The translational apparatus of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Photosynthesis research*, 82, 315-325.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 62 (3), 293-300.
- Bittencourt, D. und Auboeuf, D. (2012) Analysis of co-transcriptional RNA processing by RNA-ChIP assay. *Methods in molecular biology*, 809, 563-577.
- Bittencourt, D., Dutertre, M., Sanchez, G., Barbier, J., Gratadou, L. und Auboeuf, D. (2008) Cotranscriptional splicing potentiates the mRNA production from a subset of estradiol-stimulated genes. *Molecular and cellular biology*, 28, 5811-5824.
- Blanchard, J.L. und Lynch, M. (2000) Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends in genetics : TIG*, 16, 315-320.
- Bochkareva, A. und Zenkin, N. (2013) The sigma70 region 1.2 regulates promoter escape by unwinding DNA downstream of the transcription start site. *Nucleic acids research*, 41, 4565-4572.
- Bock, R. ed (2007) *Cell and Molecular Biology of Plastids* Berlin / Heidelberg: Springer.
- Bock, R., Hermann, M. und Kössel, H. (1996) In vivo dissection of cis-acting determinants for plastid RNA editing. *The EMBO journal*, 15, 5052-5059.
- Bock, R., Kössel, H. und Maliga, P. (1994) Introduction of a heterologous editing site into the tobacco plastid genome: the lack of RNA editing leads to a mutant phenotype. *The EMBO journal*, 13, 4623-4628.
- Bogorad, L. (1991) Replication and transcription of plastid DNA. *Cell culture and somatic cell genetics of plants*, 7, 93-124.
- Bohne, A., Weihe, A. und Börner, T. (2009) Transfer RNAs inhibit Arabidopsis phage-type RNA polymerases. *Endocytobiosis Cell Res.*, 19, 63-69.
- Bollenbach, T.J., Schuster, G., Portnoy, V. und Stern, D. (2007) Processing, degradation, and polyadenylation of chloroplast transcripts. In *Cell and Molecular Biology of Plastids* (Bock, R. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 175-211.
- Boussardon, C., Salone, V., Avon, A., Berthome, R., Hammani, K., Okuda, K., Shikanai, T., Small, I. und Lurin, C. (2012) Two interacting proteins are necessary for the editing of the NdhD-1 site in Arabidopsis plastids. *The Plant cell*, 24, 3684-3694.

- Briat, J.F., Laulhere, J.P. und Mache, R. (1979) Transcription activity of a DNA-protein complex isolated from spinach plastids. *European journal of biochemistry / FEBS*, 98, 285-292.
- Brueckner, F., Armache, K.J., Cheung, A., Damsma, G.E., Kettenberger, H., Lehmann, E., Sydow, J. und Cramer, P. (2009a) Structure-function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 65, 112-120.
- Brueckner, F., Ortiz, J. und Cramer, P. (2009b) A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Current opinion in structural biology*, 19, 294-299.
- Burmann, B.M., Schweimer, K., Luo, X., Wahl, M.C., Stitt, B.L., Gottesman, M.E. und Rosch, P. (2010) A NusE:NusG complex links transcription and translation. *Science*, 328, 501-504.
- Canino, G., Bocian, E., Barbezier, N., Echeverria, M., Forner, J., Binder, S. und Marchfelder, A. (2009) Arabidopsis encodes four tRNase Z enzymes. *Plant physiology*, 150, 1494-1502.
- Chang, C.C., Sheen, J., Bligny, M., Niwa, Y., Lerbs-Mache, S. und Stern, D.B. (1999) Functional analysis of two maize cDNAs encoding T7-like RNA polymerases. *The Plant cell*, 11, 911-926.
- Chateigner-Boutin, A.L. und Hanson, M.R. (2002) Cross-competition in transgenic chloroplasts expressing single editing sites reveals shared cis elements. *Molecular and cellular biology*, 22, 8448-8456.
- Chateigner-Boutin, A.L. und Hanson, M.R. (2003) Developmental co-variation of RNA editing extent of plastid editing sites exhibiting similar cis-elements. *Nucleic acids research*, 31, 2586-2594.
- Chateigner-Boutin, A.L., Ramos-Vega, M., Guevara-Garcia, A., Andres, C., de la Luz Gutierrez-Nava, M., Cantero, A., Delannoy, E., Jimenez, L.F., Lurin, C., Small, I. und Leon, P. (2008) CLB19, a pentatricopeptide repeat protein required for editing of rpoA and clpP chloroplast transcripts. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56, 590-602.
- Chen, L.-J. und Orozco, E.M. (1988) Recognition of prokaryotic transcription terminators by spinach chloroplast RNA polymerase. *Nucl. Acids Res.*, 16, 8411-8431.
- Cheung, A.C. und Cramer, P. (2012) A movie of RNA polymerase II transcription. *Cell*, 149, 1431-1437.
- Christopher, D.A. und Mullet, J.E. (1994) Separate photosensory pathways co-regulate blue light/ultraviolet-A-activated psbD-psbC transcription and light-induced D2 and CP43 degradation in barley (*Hordeum vulgare*) chloroplasts. *Plant physiology*, 104, 1119-1129.

- Chun, L., Kawakami, A. und Christopher, D.A. (2001) Phytochrome A mediates blue light and UV-A-dependent chloroplast gene transcription in green leaves. *Plant physiology*, 125, 1957-1966.
- Core, L.J. und Lis, J.T. (2008) Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science*, 319, 1791-1792.
- Courtois, F., Merendino, L., Demarsy, E., Mache, R. und Lerbs-Mache, S. (2007) Phage-type RNA polymerase RPOTmp transcribes the *rrn* operon from the PC promoter at early developmental stages in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 145, 712-721.
- da Costa e Silva, O., Lorbiecke, R., Garg, P., Muller, L., Wassmann, M., Lauert, P., Scanlon, M., Hsia, A.P., Schnable, P.S., Krupinska, K. und Wienand, U. (2004) The Etched1 gene of *Zea mays* (L.) encodes a zinc ribbon protein that belongs to the transcriptionally active chromosome (TAC) of plastids and is similar to the transcription factor TFIIS. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 38, 923-939.
- de Longevialle, A.F., Hendrickson, L., Taylor, N.L., Delannoy, E., Lurin, C., Badger, M., Millar, A.H. und Small, I. (2008) The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid *ycf3* intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 56, 157-168.
- De Santis-Maciossek, G., Kofer, W., Bock, A., Schoch, S., Maier, R.M., Wanner, G., Rudiger, W., Koop, H.U. und Herrmann, R.G. (1999) Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 18, 477-489.
- Delannoy, E., Le Ret, M., Faivre-Nitschke, E., Estavillo, G.M., Bergdoll, M., Taylor, N.L., Pogson, B.J., Small, I., Imbault, P. und Gualberto, J.M. (2009) *Arabidopsis* tRNA adenosine deaminase arginine edits the wobble nucleotide of chloroplast tRNA^{Arg}(ACG) and is essential for efficient chloroplast translation. *The Plant cell*, 21, 2058-2071.
- Demarsy, E., Buhr, F., Lambert, E. und Lerbs-Mache, S. (2012) Characterization of the plastid-specific germination and seedling establishment transcriptional programme. *Journal of experimental botany*, 63, 925-939.
- Demarsy, E., Courtois, F., Azevedo, J., Buhot, L. und Lerbs-Mache, S. (2006) Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant physiology*, 142, 993-1003.
- Drescher, A., Ruf, S., Calsa, T., Jr., Carrer, H. und Bock, R. (2000) The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 22, 97-104.

- DuBell, A.N. und Mullet, J.E. (1995) Differential Transcription of Pea Chloroplast Genes during Light-Induced Leaf Development (Continuous Far-Red Light Activates Chloroplast Transcription). *Plant physiology*, 109, 105-112.
- Eisermann, A., Tiller, K. und Link, G. (1990) *In vitro* transcription and DNA binding characteristics of chloroplast and etioplast extracts from mustard (*Sinapis alba*) indicate differential usage of the *psbA* promoter. *EMBO J.*, 9, 3981-3987.
- Ellis, R.J. (1979) The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, 4, 241-244.
- Emanuel, C., von Groll, U., Muller, M., Börner, T. und Weihe, A. (2006) Development- and tissue-specific expression of the RpoT gene family of Arabidopsis encoding mitochondrial and plastid RNA polymerases. *Planta*, 223, 998-1009.
- Emanuel, C., Weihe, A., Graner, A., Hess, W.R. und Börner, T. (2004) Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 38, 460-472.
- Ems, S.C., Morden, C.W., Dixon, C.K., Wolfe, K.H., dePamphilis, C.W. und Palmer, J.D. (1995) Transcription, splicing and editing of plastid RNAs in the nonphotosynthetic plant *Epifagus virginiana*. *Plant molecular biology*, 29, 721-733.
- Epshtein, V., Cardinale, C.J., Ruckenstein, A.E., Borukhov, S. und Nudler, E. (2007) An allosteric path to transcription termination. *Molecular cell*, 28, 991-1001.
- Epshtein, V., Dutta, D., Wade, J. und Nudler, E. (2010) An allosteric mechanism of Rho-dependent transcription termination. *Nature*, 463, 245-249.
- Fargo, D.C., Zhang, M., Gillham, N.W. und Boynton, J.E. (1998) Shine-Dalgarno-like sequences are not required for translation of chloroplast mRNAs in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts or in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, 257, 271-282.
- Fedorova, O., Waldsich, C. und Pyle, A.M. (2007) Group II intron folding under near-physiological conditions: collapsing to the near-native state. *Journal of molecular biology*, 366, 1099-1114.
- Finkemeier, I.a.L., D (2010) Plant Chloroplasts and Other Plastids. *eLS*.
- Finster, S., Eggert, E., Zoschke, R., Weihe, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2013) Light-dependent, plastome-wide association of the plastid-encoded RNA polymerase with chloroplast DNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- Finster, S., Legen, J., Qu, Y. und Schmitz-Linneweber, C. (2012) Land Plant RNA Editing or: Don't Be Fooled by Plant Organellar DNA Sequences. In *Genomics*

- of Chloroplasts and Mitochondria* (Bock, R. und Knoop, V. eds): Springer Netherlands, pp. pp 293-321.
- Fleischmann, T.T., Scharff, L.B., Alkatib, S., Hasdorf, S., Schottler, M.A. und Bock, R. (2011) Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *The Plant cell*, 23, 3137-3155.
- Folta, K.M. und Maruhnich, S.A. (2007) Green light: a signal to slow down or stop. *Journal of experimental botany*, 58, 3099-3111.
- Fristedt, R., Scharff, L.B., Clarke, C.A., Wang, Q., Lin, C., Merchant, S.S. und Bock, R. (2014) RBF1, a Plant Homolog of the Bacterial Ribosome-Binding Factor RbfA, Acts in Processing of the Chloroplast 16S Ribosomal RNA. *Plant physiology*, 164, 201-215.
- Fujiwara, M., Nagashima, A., Kanamaru, K., Tanaka, K. und Takahashi, H. (2000) Three new nuclear genes, sigD, sigE and sigF, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 481, 47-52.
- Gamble, P. und Mullet, J. (1989) Translation and stability of proteins encoded by the plastid psbA and psbB genes are regulated by a nuclear gene during light-induced chloroplast development in barley. *J. Biol. Chem.*, 264, 7236-7243.
- Gao, Z.P., Chen, G.X. und Yang, Z.N. (2012) Regulatory role of *Arabidopsis* pTAC14 in chloroplast development and plastid gene expression. *Plant signaling & behavior*, 7, 1354-1356.
- Gao, Z.P., Yu, Q.B., Zhao, T.T., Ma, Q., Chen, G.X. und Yang, Z.N. (2011) A functional component of the transcriptionally active chromosome complex, *Arabidopsis* pTAC14, interacts with pTAC12/HEMERA and regulates plastid gene expression. *Plant physiology*, 157, 1733-1745.
- Garcia, M., Myouga, F., Takechi, K., Sato, H., Nabeshima, K., Nagata, N., Takio, S., Shinozaki, K. und Takano, H. (2008) An *Arabidopsis* homolog of the bacterial peptidoglycan synthesis enzyme MurE has an essential role in chloroplast development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 53, 924-934.
- Germain, A., Kim, S.H., Gutierrez, R. und Stern, D.B. (2012) Ribonuclease II preserves chloroplast RNA homeostasis by increasing mRNA decay rates, and cooperates with polynucleotide phosphorylase in 3' end maturation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*.
- Gilchrist, D.A., Fargo, D.C. und Adelman, K. (2009) Using ChIP-chip and ChIP-seq to study the regulation of gene expression: genome-wide localization studies reveal widespread regulation of transcription elongation. *Methods*, 48, 398-408.
- Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gossringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R.K., Rossmannith, W. und Giege, P. (2010) A single *Arabidopsis* organellar

- protein has RNase P activity. *Nature structural & molecular biology*, 17, 740-744.
- Goldschmidt-Clermont, M. (1998) Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *International Rev. Cyt.*, 177, 115-180.
- Gott, J.M. und Emeson, R.B. (2000) Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual review of genetics*, 34, 499-531.
- Gould, S.B., Waller, R.F. und McFadden, G.I. (2008) Plastid evolution. *Annual review of plant biology*, 59, 491-517.
- Gowrishankar, J. und Harinarayanan, R. (2004) Why is transcription coupled to translation in bacteria? *Molecular microbiology*, 54, 598-603.
- Gray, M.W. (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Current opinion in genetics & development*, 3, 884-890.
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Canaani, O., Malkin, S., Mattoo, A.K. und Edelman, M. (1989) Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6617-6620.
- Greenberg, B.M., Narita, J.O., Deluca-Flaherty, C., Grussem, W., Rushlow, K.A. und Hallick, R.B. (1984) Evidence for two RNA polymerase activities in *Euglena gracilis* chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 259, 14880-14887.
- Grussem, W., Barkan, A., Deng, X.W. und Stern, D. (1988) Transcriptional and post-transcriptional control of plastid mRNA levels in higher plants. *Trends in genetics : TIG*, 4, 258-263.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R. und Young, R.A. (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell*, 130, 77-88.
- Guertin, M. und Bellemare, G. (1979) Synthesis of chloroplast ribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii* toluene-treated cells. *European journal of biochemistry / FEBS*, 96, 125-129.
- Hajdukiewicz, P., Allison, L. und Maliga, P. (1997a) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO journal*, 16, 4041-4048.
- Hajdukiewicz, P.T., Allison, L.A. und Maliga, P. (1997b) The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *The EMBO journal*, 16, 4041-4048.
- Haley, J. und Bogorad, L. (1990) Alternative promoters are used for genes within maize chloroplast polycistronic transcription units. *The Plant cell*, 2, 323-333.

- Hallick, R.B., Lipper, C., Richards, O.C. und Rutter, W.J. (1976) Isolation of a transcriptionally active chromosome from chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Biochemistry*, 15, 3039-3045.
- Hammani, K., Okuda, K., Tanz, S.K., Chateigner-Boutin, A.L., Shikanai, T. und Small, I. (2009) A study of new *Arabidopsis* chloroplast RNA editing mutants reveals general features of editing factors and their target sites. *The Plant cell*, 21, 3686-3699.
- Han, C.-D., Patrie, W., Polacco, M. und Coe, E.H. (1993) Aberrations in plastid transcripts and deficiency of plastid DNA in striped and albino mutants in maize. *Planta*, 191, 552-563.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166, 557-580.
- Hanaoka, M., Kanamaru, K., Fujiwara, M., Takahashi, H. und Tanaka, K. (2005) Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis. *EMBO reports*, 6, 545-550.
- Hanaoka, M., Kato, M., Anma, M. und Tanaka, K. (2012) SIG1, a Sigma Factor for the Chloroplast RNA Polymerase, Differently Associates with Multiple DNA Regions in the Chloroplast Chromosomes in Vivo. *International journal of molecular sciences*, 13, 12182-12194.
- Hattori, M., Miyake, H. und Sugita, M. (2007) A Pentatricopeptide repeat protein is required for RNA processing of *clpP* Pre-mRNA in moss chloroplasts. *The Journal of biological chemistry*, 282, 10773-10782.
- Haugen, P., Simon, D.M. und Bhattacharya, D. (2005) The natural history of group I introns. *Trends in genetics : TIG*, 21, 111-119.
- Hedberg, M.F., Huang, Y.S. und Hommersand, M.H. (1981) Size of the Chloroplast Genome in *Codium fragile*. *Science*, 213, 445-447.
- Hess, W.R. und Börner, T. (1999) Organellar RNA polymerases of higher plants. *International review of cytology*, 190, 1-59.
- Hess, W.R., Prombona, A., Fieder, B., Subramanian, A.R. und Börner, T. (1993) Chloroplast *rps15* and the *rpoB/C1/C2* gene cluster are strongly transcribed in ribosome-deficient plastids: evidence for a functioning non-chloroplast-encoded RNA polymerase. *The EMBO journal*, 12, 563-571.
- Hirose, T., Kusumegi, T. und Sugiura, M. (1998) Translation of tobacco chloroplast *rps14* mRNA depends on a Shine-Dalgarno-like sequence in the 5'-untranslated region but not on internal RNA editing in the coding region. *FEBS letters*, 430, 257-260.

- Hirose, T., Kusumegi, T., Tsudzuki, T. und Sugiura, M. (1999) RNA editing sites in tobacco chloroplast transcripts: editing as a possible regulator of chloroplast RNA polymerase activity. *Molecular & general genetics : MGG*, 262, 462-467.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (1996) *Cis*-acting elements and *trans*-acting factors for accurate translation of chloroplast *psbA* mRNAs: development of an in vitro translation system from tobacco chloroplasts. *The EMBO journal*, 15, 1687-1695.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (1997) Both RNA editing and RNA cleavage are required for translation of tobacco chloroplast *ndhD* mRNA: a possible regulatory mechanism for the expression of a chloroplast operon consisting of functionally unrelated genes. *The EMBO journal*, 16, 6804-6811.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (2001) Involvement of a site-specific *trans*-acting factor and a common RNA-binding protein in the editing of chloroplast mRNAs: development of a chloroplast in vitro RNA editing system. *The EMBO journal*, 20, 1144-1152.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (2004a) Functional Shine-Dalgarno-like sequences for translational initiation of chloroplast mRNAs. *Plant & cell physiology*, 45, 114-117.
- Hirose, T. und Sugiura, M. (2004b) Multiple elements required for translation of plastid *atpB* mRNA lacking the Shine-Dalgarno sequence. *Nucleic acids research*, 32, 3503-3510.
- Hoch, B., Maier, R.M., Appel, K., Igloi, G.L. und Kössel, H. (1991) Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation codon. *Nature*, 353, 178-180.
- Hricova, A., Quesada, V. und Micol, J.L. (2006) The SCABRA3 nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in Arabidopsis. *Plant physiology*, 141, 942-956.
- Hu, J. und Bogorad, L. (1990) Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1531-1535.
- Hu, J., Troxler, R.F. und Bogorad, L. (1991) Maize chloroplast RNA polymerase: the 78-kilodalton polypeptide is encoded by the plastid *rpoC1* gene. *Nucl. Acids Res.*, 19, 3431-3434.
- Hubschmann, T. und Börner, T. (1998) Characterisation of transcript initiation sites in ribosome-deficient barley plastids. *Plant molecular biology*, 36, 493-496.
- Hwang, S., Kawazoe, R. und Herrin, D.L. (1996) Transcription of *tufA* and other chloroplast-encoded genes is controlled by a circadian clock in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 996-1000.

- Igloi, G.L. und Kössel, H. (1992) The transcriptional Apparatus of Chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 10, 525-558.
- Imamura, S., Yoshihara, S., Nakano, S., Shiozaki, N., Yamada, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Asayama, M. und Shirai, M. (2003) Purification, characterization, and gene expression of all sigma factors of RNA polymerase in a cyanobacterium. *Journal of molecular biology*, 325, 857-872.
- Ishizaki, Y., Tsunoyama, Y., Hatano, K., Ando, K., Kato, K., Shinmyo, A., Kobori, M., Takeba, G., Nakahira, Y. und Shiina, T. (2005) A nuclear-encoded sigma factor, Arabidopsis SIG6, recognizes sigma-70 type chloroplast promoters and regulates early chloroplast development in cotyledons. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 42, 133-144.
- Isono, K., Niwa, Y., Satoh, K. und Kobayashi, H. (1997a) Evidence for transcriptional regulation of plastid photosynthesis genes in Arabidopsis thaliana roots. *Plant physiology*, 114, 623-630.
- Isono, K., Shimizu, M., Yoshimoto, K., Niwa, Y., Satoh, K., Yokata, A. und Kobayashi, H. (1997b) Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of sigma70 factors of bacterial RNA polymerases in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 14948-14953.
- Iyer, L.M. und Aravind, L. (2012) Insights from the architecture of the bacterial transcription apparatus. *Journal of structural biology*, 179, 299-319.
- Jeon, Y., Jung, H.J., Kang, H., Park, Y.I., Lee, S.H. und Pai, H.S. (2012) S1 domain-containing STF modulates plastid transcription and chloroplast biogenesis in Nicotiana benthamiana. *The New phytologist*, 193, 349-363.
- Jeong, S.Y., Rose, A. und Meier, I. (2003) MFP1 is a thylakoid-associated, nucleoid-binding protein with a coiled-coil structure. *Nucleic acids research*, 31, 5175-5185.
- Johnson, L., Cao, X. und Jacobsen, S. (2002) Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Current biology : CB*, 12, 1360-1367.
- Kanamaru, K., Fujiwara, M., Seki, M., Katagiri, T., Nakamura, M., Mochizuki, N., Nagatani, A., Shinozaki, K., Tanaka, K. und Takahashi, H. (1999) Plastidic RNA polymerase sigma factors in Arabidopsis. *Plant & cell physiology*, 40, 832-842.
- Kanamaru, K., Nagashima, A., Fujiwara, M., Shimada, H., Shirano, Y., Nakabayashi, K., Shibata, D., Tanaka, K. und Takahashi, H. (2001) An Arabidopsis sigma factor (SIG2)-dependent expression of plastid-encoded tRNAs in chloroplasts. *Plant & cell physiology*, 42, 1034-1043.

- Kaneko, S. und Manley, J.L. (2005) The mammalian RNA polymerase II C-terminal domain interacts with RNA to suppress transcription-coupled 3' end formation. *Molecular cell*, 20, 91-103.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 3, 109-136.
- Kapoor, S. und Sugiura, M. (1999) Identification of two essential sequence elements in the nonconsensus type II PatpB-290 plastid promoter by using plastid transcription extracts from cultured tobacco BY-2 cells. *The Plant cell*, 11, 1799-1810.
- Karcher, D., Koster, D., Schadach, A., Klevesath, A. und Bock, R. (2009) The *Chlamydomonas* chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Molecular plant*, 2, 1223-1232.
- Kawazoe, R., Mahan, K.M., Venghaus, B.E., Carter, M.L. und Herrin, D.L. (2012) Circadian regulation of chloroplast transcription in *Chlamydomonas* is accompanied by little or no fluctuation in RPOD levels or core RNAP activity. *Molecular biology reports*, 39, 10565-10571.
- Kim, M., Rapp, J.C. und Mullet, J.E. (1993) Direct evidence for selective modulation of psbA, rpoA, rbcL, and 16S RNA stability during barley chloroplast development. *Plant Molec. Biol.*, 22, 447-463.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D. und Ren, B. (2005) A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature*, 436, 876-880.
- Kindgren, P., Kremnev, D., Blanco, N.E., de Dios Barajas Lopez, J., Fernandez, A.P., Tellgren-Roth, C., Kleine, T., Small, I. und Strand, A. (2012) The plastid redox insensitive 2 mutant of *Arabidopsis* is impaired in PEP activity and high light-dependent plastid redox signalling to the nucleus. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 70, 279-291.
- Kireeva, M.L., Komissarova, N., Waugh, D.S. und Kashlev, M. (2000) The 8-nucleotide-long RNA:DNA hybrid is a primary stability determinant of the RNA polymerase II elongation complex. *The Journal of biological chemistry*, 275, 6530-6536.
- Klaff, P. und Gruissem, W. (1991) Changes in chloroplast mRNA stability during leaf development. *The Plant cell*, 3, 517-529.

- Klein, R. und Mullet, J. (1990) Light-induced transcription of chloroplast genes. *J. Biol. Chem.*, 265, 1895-1902.
- Klein, R.R. (1991) Regulation of light-induced chloroplast transcription and translation in eight-day- old dark-grown barley seedlings. *Plant Physiol.*, 97, 335-342.
- Klein, R.R., Mason, H.S. und Mullet, J.E. (1988) Light-regulated translation of chloroplast proteins. I. Transcripts of psaA-psaB, psbA, and rbcL are associated with polysomes in dark-grown and illuminated barley seedlings. *J. Cell Biol.*, 106, 289-301.
- Klein, R.R. und Mullet, J.E. (1986) Regulation of chloroplast-encoded chlorophyll-binding protein translation during higher plant chloroplast biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 261, 11138-11145.
- Klein, R.R. und Mullet, J.E. (1987) Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of psbA, psaA-psaB, and rbcL in dark-grown and illuminated barley seedlings. *The Journal of biological chemistry*, 262, 4341-4348.
- Knoop, V. (2011) When you can't trust the DNA: RNA editing changes transcript sequences. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68, 567-586.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S.Y., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M. und Kuroiwa, T. (2002) Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *The Plant cell*, 14, 1579-1589.
- Kornberg, R.D. (2007) The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 12955-12961.
- Kotera, E., Tasaka, M. und Shikanai, T. (2005) A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature*, 433, 326-330.
- Krause, K., Berg, S. und Krupinska, K. (2003) Plastid transcription in the holoparasitic plant genus *Cuscuta*: parallel loss of the rrn16 PEP-promoter and of the rpoA and rpoB genes coding for the plastid-encoded RNA polymerase. *Planta*, 216, 815-823.
- Krause, K. und Krupinska, K. (2000) Molecular and functional properties of highly purified transcriptionally active chromosomes from spinach chloroplasts. *Physiol Plant*, 109, 188-195.
- Krause, K., Maier, R.M., Kofer, W., Krupinska, K. und Herrmann, R.G. (2000) Disruption of plastid-encoded RNA polymerase genes in tobacco: expression of only a distinct set of genes is not based on selective transcription of the plastid chromosome. *Molecular & general genetics : MGG*, 263, 1022-1030.

- Kröger, T.S., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J. und Barkan, A. (2009) A plant-specific RNA-binding domain revealed through analysis of chloroplast group II intron splicing. *PNAS*, 106, 4537-42.
- Krupinska, K., Melonek, J. und Krause, K. (2013) New insights into plastid nucleoid structure and functionality. *Planta*, 237, 653-664.
- Kugita, M., Yamamoto, Y., Fujikawa, T., Matsumoto, T. und Yoshinaga, K. (2003) RNA editing in hornwort chloroplasts makes more than half the genes functional. *Nucleic acids research*, 31, 2417-2423.
- Kühn, K., Richter, U., Meyer, E.H., Delannoy, E., de Longevialle, A.F., O'Toole, N., Börner, T., Millar, A.H., Small, I.D. und Whelan, J. (2009) Phage-type RNA polymerase RPOTmp performs gene-specific transcription in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell*, 21, 2762-2779.
- Kupsch, C., Ruwe, H., Gusewski, S., Tillich, M., Small, I. und Schmitz-Linneweber, C. (2012) *Arabidopsis* chloroplast RNA binding proteins CP31A and CP29A associate with large transcript pools and confer cold stress tolerance by influencing multiple chloroplast RNA processing steps. *The Plant cell*, 24, 4266-4280.
- Kuroiwa, T. (1991) The replication, differentiation, und inheritance of plastids with emphasis on the concept of organelle nuclei. *International review of cytology*, 128, 1-62.
- Kutschera, U. und Niklas, K.J. (2004) The modern theory of biological evolution: an expanded synthesis. *Die Naturwissenschaften*, 91, 255-276.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I. und Deng, X.W. (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *The Plant cell*, 19, 731-749.
- Legen, J., Kemp, S., Krause, K., Profanter, B., Herrmann, R.G. und Maier, R.M. (2002) Comparative analysis of plastid transcription profiles of entire plastid chromosomes from tobacco attributed to wild-type and PEP-deficient transcription machineries. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 31, 171-188.
- Legen, J., Wanner, G., Herrmann, R.G., Small, I. und Schmitz-Linneweber, C. (2007) Plastid tRNA genes trnC-GCA and trnN-GUU are essential for plant cell development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 51, 751-762.
- Leister, D. (2005) Genomics-based dissection of the cross-talk of chloroplasts with the nucleus and mitochondria in *Arabidopsis*. *Gene*, 354, 110-116.

- Lerbs-Mache, S. (1993) The 110-kDa polypeptide of spinach plastid DNA-dependent RNA polymerase: Single-subunit enzyme or catalytic core of multimeric enzyme complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5509-5513.
- Lerbs-Mache, S. (2011) Function of plastid sigma factors in higher plants: regulation of gene expression or just preservation of constitutive transcription? *Plant molecular biology*, 76, 235-249.
- Liere, K. und Boerner, T. (2007) Transcription and transcriptional regulation in plastids. In *Cell and Molecular Biology of Plastids* (Bock, R. ed. New York: Springer, pp. 121-174.
- Liere, K. und Börner, T. (2007) Transcription of plastid genes. In *Regulation of Transcription in Plants* (Grasser, K.D. ed. Oxford: Blackwell Publishing, pp. 184–224.
- Liere, K. und Maliga, P. (2001) Plastid RNA polymerases in higher plants. In *Regulation of photosynthesis* ((eds), A.B.A.E.-M. ed. Kluwer, Netherlands, Dordrecht pp. pp 29–49.
- Liere, K., Weihe, A. und Börner, T. (2011) The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *Journal of plant physiology*, 168, 1345-1360.
- Link, G. (1984) DNA sequence requirements for the accurate transcription of a protein-coding plastid gene in a plastid in vitro system from mustard (*Sinapis alba* L.). *The EMBO journal*, 3, 1697-1704.
- Link, G. (1996) Green life: Control of chloroplast gene transcription. *Bioessays*, 18, 465-471.
- Link, G. (2003) Redox regulation of chloroplast transcription. *Antioxidants & redox signaling*, 5, 79-87.
- Link, S., Engelmann, K., Meierhoff, K. und Westhoff, P. (2012) The atypical short-chain dehydrogenases HCF173 and HCF244 are jointly involved in translational initiation of the psbA mRNA of Arabidopsis. *Plant physiology*, 160, 2202-2218.
- Little, M.C. und Hallick, R.B. (1988) Chloroplast rpoA, rpoB, and rpoC genes specify at least three components of a chloroplast DNA-dependent RNA polymerase active in tRNA and mRNA transcription. *The Journal of biological chemistry*, 263, 14302-14307.
- Liu, J.W. und Rose, R.J. (1992) The spinach chloroplast chromosome is bound to the thylakoid membrane in the region of the inverted repeat. *Biochemical and biophysical research communications*, 184, 993-1000.
- Lohse, M., Drechsel, O., Kahlau, S. und Bock, R. (2013) OrganellarGenomeDRAW--a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial

- genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic acids research*, 41, W575-581.
- Lopez-Juez, E. und Pyke, K.A. (2005) Plastids unleashed: their development and their integration in plant development. *The International journal of developmental biology*, 49, 557-577.
- Loschelder, H., Homann, A., Ogrzewalla, K. und Link, G. (2004) Proteomics-based sequence analysis of plant gene expression - the chloroplast transcription apparatus. *Phytochemistry*, 65, 1785-93.
- Lurin, C., Andres, C., Aubourg, S., Bellaoui, M., Bitton, F., Bruyere, C., Caboche, M., Debast, C., Gualberto, J., Hoffmann, B., Lecharny, A., Le Ret, M., Martin-Magniette, M.L., Mireau, H., Peeters, N., Renou, J.P., Szurek, B., Taconnat, L. und Small, I. (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *The Plant cell*, 16, 2089-2103.
- Luro, S., Germain, A., Sharwood, R.E. und Stern, D.B. (2013) RNase J participates in a pentatricopeptide repeat protein-mediated 5' end maturation of chloroplast mRNAs. *Nucleic acids research*.
- Lysenko, E.A. (2007) Plant sigma factors and their role in plastid transcription. *Plant cell reports*, 26, 845-859.
- Lysenko, E.A. und Kuznetsov, V.V. (2005) [Plastid RNA polymerases]. *Molekuliarnaia biologiya*, 39, 762-775.
- Lyska, D., Meierhoff, K. und Westhoff, P. (2013) How to build functional thylakoid membranes: from plastid transcription to protein complex assembly. *Planta*, 237, 413-428.
- Maier, U.-G., Bozarth, A., Funk, H., Zauner, S., Rensing, S., Schmitz-Linneweber, C., Börner, T. und Tillich, M. (2008) Complex Chloroplast RNA Metabolism: Just Debugging the Genetic Programme? *BMC Evol Biol*, in press.
- Majeran, W., Friso, G., Asakura, Y., Qu, X., Huang, M., Ponnala, L., Watkins, K.P., Barkan, A. und van Wijk, K.J. (2012) Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions. *Plant physiology*, 158, 156-189.
- Maliga, P. (2004) Plastid transformation in higher plants. *Ann Rev Plant Biol*, 55, 289-313.
- Marano, M.R. und Carrillo, N. (1992) Constitutive Transcription and Stable RNA Accumulation in Plastids during the Conversion of Chloroplasts to Chromoplasts in Ripening Tomato Fruits. *Plant physiology*, 100, 1103-1113.
- Margulis, L. (1970) *Origin of Eucaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press.

- Marin-Navarro, J., Manuell, A.L., Wu, J. und S, P.M. (2007) Chloroplast translation regulation. *Photosynthesis research*, 94, 359-374.
- Martin, W. (2003) Gene transfer from organelles to the nucleus: frequent and in big chunks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8612-8614.
- Mathews, D.E. und Durbin, R.D. (1990) Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 265, 493-498.
- Mayfield, S.P., Cohen, A., Danon, A. und Yohn, C.B. (1994) Translation of the psbA mRNA of *Chlamydomonas reinhardtii* requires a structured RNA element contained within the 5' untranslated region. *The Journal of cell biology*, 127, 1537-1545.
- McNeal, J.R., Kuehl, J.V., Boore, J.L. und de Pamphilis, C.W. (2007) Complete plastid genome sequences suggest strong selection for retention of photosynthetic genes in the parasitic plant genus *Cuscuta*. *BMC plant biology*, 7, 57.
- Melonek, J., Matros, A., Trosch, M., Mock, H.P. und Krupinska, K. (2012) The core of chloroplast nucleoids contains architectural SWIB domain proteins. *The Plant cell*, 24, 3060-3073.
- Mereschkowsky, C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreich. *Biol. Centralbl.*, 25, 593-604.
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer, A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A. und Chory, J. (2008) Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS genetics*, 4, e14.
- Miyagi, T., Kapoor, S., Sugita, M. und Sugiura, M. (1998) Transcript analysis of the tobacco plastid operon *rps2/atpl/H/F/A* reveals the existence of a non-consensus type II (NCII) promoter upstream of the atpl coding sequence. *Molecular & general genetics : MGG*, 257, 299-307.
- Miyamura, S., Nagata, T. und Kuroiwa, T. (1986) Quantitative fluorescence microscopy on dynamic changes of plastid nucleoids during wheat development. *Protoplasma*, 133, 66-72.
- Mochizuki, T., Onda, Y., Fujiwara, E., Wada, M. und Toyoshima, Y. (2004) Two independent light signals cooperate in the activation of the plastid psbD blue light-responsive promoter in *Arabidopsis*. *FEBS letters*, 571, 26-30.
- Mooney, R.A., Davis, S.E., Peters, J.M., Rowland, J.L., Ansari, A.Z. und Landick, R. (2009) Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. *Molecular cell*, 33, 97-108.

- Morikawa, K., Ito, S., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y., Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1999) Circadian-regulated expression of a nuclear encoded plastid sigma factor gene (sigA) in wheat seedlings. *FEBS letters*, 451, 275-8
- Mullet, J.E. (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.*, 103, 309-313.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.*, 15, 473-497.
- Myouga, F., Hosoda, C., Umezawa, T., Iizumi, H., Kuromori, T., Motohashi, R., Shono, Y., Nagata, N., Ikeuchi, M. und Shinozaki, K. (2008) A heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20, 3148-3162.
- Nakahira, Y., Baba, K., Yoneda, A., Shiina, T. und Toyoshima, Y. (1998) Circadian-regulated transcription of the psbD light-responsive promoter in wheat chloroplasts. *Plant physiology*, 118, 1079-1088.
- Newell, C.A. und Gray, J.C. (2010) Binding of lac repressor-GFP fusion protein to lac operator sites inserted in the tobacco chloroplast genome examined by chromatin immunoprecipitation. *Nucleic acids research*, 38, e145.
- Noordally, Z.B., Ishii, K., Atkins, K.A., Wetherill, S.J., Kusakina, J., Walton, E.J., Kato, M., Azuma, M., Tanaka, K., Hanaoka, M. und Dodd, A.N. (2013) Circadian control of chloroplast transcription by a nuclear-encoded timing signal. *Science*, 339, 1316-1319.
- Okuda, K., Chateigner-Boutin, A.L., Nakamura, T., Delannoy, E., Sugita, M., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K., Small, I. und Shikanai, T. (2009) Pentatricopeptide repeat proteins with the DYW motif have distinct molecular functions in RNA editing and RNA cleavage in Arabidopsis chloroplasts. *The Plant cell*, 21, 146-156.
- Okuda, K., Myouga, F., Motohashi, R., Shinozaki, K. und Shikanai, T. (2007) Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 8178-8183.
- Okuda, K., Nakamura, T., Sugita, M., Shimizu, T. und Shikanai, T. (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *The Journal of biological chemistry*, 281, 37661-37667.
- Ostersetzer, O., Cooke, A.M., Watkins, K.P. und Barkan, A. (2005) CRS1, a Chloroplast Group II Intron Splicing Factor, Promotes Intron Folding through Specific Interactions with Two Intron Domains. *The Plant cell*, 17, 241-255.
- Ostheimer, G.J., Rojas, M., Hadjivassiliou, H. und Barkan, A. (2006) Formation of the CRS2-CAF2 group II intron splicing complex is mediated by a 22-amino acid

- motif in the COOH-terminal region of CAF2. *The Journal of biological chemistry*, 281, 4732-4738.
- Ostheimer, G.J., Williams-Carrier, R., Belcher, S., Osborne, E., Gierke, J. und Barkan, A. (2003) Group II intron splicing factors derived by diversification of an ancient RNA-binding domain. *The EMBO journal*, 22, 3919-3929.
- Palmer, J.D. (1985) Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual review of genetics*, 19, 325-354.
- Palmer, J.D. und Delwiche, C.F. (1997) The origin of plastids and their genomes. In *Molecular Systematics of Plants*. (Soltis, P.S., Soltis, D.S. und Doyle, J.J. eds). Norwell: Chapman und Hall/Kluwer, pp. 375-409.
- Peled-Zehavi, H. und Danon, A. (2007) Translation and translational regulation in chloroplasts. In *Cell and Molecular Biology of Plastids* (Bock, R. ed. New York: Springer, pp. 249-282.
- Pfalz, J., Bayraktar, O.A., Prikryl, J. und Barkan, A. (2009) Site-specific binding of a PPR protein defines and stabilizes 5' and 3' mRNA termini in chloroplasts. *The EMBO journal*, 28, 2042-2052.
- Pfalz, J., Liere, K., Kandlbinder, A., Dietz, K.J. und Oelmüller, R. (2006) pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *The Plant cell*, 18, 176-197.
- Pfalz, J. und Pfannschmidt, T. (2013) Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends in plant science*, 18, 186-194.
- Pfannschmidt, T. und Liere, K. (2005) Redox regulation and modification of proteins controlling chloroplast gene expression. *Antioxidants & redox signaling*, 7, 607-618.
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1994) Separation of two classes of plastid DNA-dependent RNA polymerases that are differentially expressed in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings. *Plant molecular biology*, 25, 69-81.
- Pfannschmidt, T. und Link, G. (1997) The A and B forms of plastid DNA-dependent RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba* L.) transcribe the same genes in a different developmental context. *Molecular & general genetics : MGG*, 257, 35-44.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Tullberg, A. und Allen, J.F. (1999a) Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, 397, 625-628.
- Pfannschmidt, T., Nilsson, A., Tullberg, A., Link, G. und Allen, J.F. (1999b) Direct transcriptional control of the chloroplast genes *psbA* and *psaAB* adjusts photosynthesis to light energy distribution in plants. *IUBMB Life*, 48, 271-276.

- Pfannschmidt, T., Ogrzewalla, K., Baginsky, S., Sickmann, A., Meyer, H.E. und Link, G. (2000) The multisubunit chloroplast RNA polymerase A from mustard (*Sinapis alba* L.). Integration of a prokaryotic core into a larger complex with organelle-specific functions. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 253-261.
- Piechulla, B. und Gruissem, W. (1987) Diurnal mRNA fluctuations of nuclear and plastid genes in developing tomato fruits. *The EMBO journal*, 6, 3593-3599.
- Pokorska, B., Zienkiewicz, M., Powikrowska, M., Drozak, A. und Romanowska, E. (2009) Differential turnover of the photosystem II reaction centre D1 protein in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of maize. *Biochimica et biophysica acta*, 1787, 1161-1169.
- Prikryl, J., Rojas, M., Schuster, G. und Barkan, A. (2011) Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 415-420.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., Wijk, K.J. und Barkan, A. (2008) A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic acids research*.
- Proshkin, S., Rahmouni, A.R., Mironov, A. und Nudler, E. (2010) Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*, 328, 504-508.
- Ramundo, S., Rahire, M., Schaad, O. und Rochaix, J.D. (2013) Repression of essential chloroplast genes reveals new signaling pathways and regulatory feedback loops in *Chlamydomonas*. *The Plant cell*, 25, 167-186.
- Rapp, J.C., Baumgartner, B.J. und Mullet, J. (1992) Quantitative analysis of transcription and RNA levels of 15 barley chloroplast genes: transcription rates and mRNA levels vary over 300-fold; predicted mRNA stabilities vary 30-fold. *J. Biol. Chem.*, 267, 21404-21411.
- Reiss, T. und Link, G. (1985) Characterization of transcriptionally active DNA-protein complexes from chloroplasts and etioplasts of mustard (*Sinapis alba* L.). *European journal of biochemistry / FEBS*, 148, 207-212.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, J.J., Aparicio, O., Jennings, E.G., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E., Volkert, T.L., Wilson, C.J., Bell, S.P. und Young, R.A. (2000) Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 290, 2306-2309.
- Reppas, N.B., Wade, J.T., Church, G.M. und Struhl, K. (2006) The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Molecular cell*, 24, 747-757.

- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotech.*, 17, 1030-1032.
- Rogalski, M., Ruf, S. und Bock, R. (2006) Tobacco plastid ribosomal protein S18 is essential for cell survival. *Nucleic acids research*, 34, 4537-4545.
- Rogalski, M., Schottler, M.A., Thiele, W., Schulze, W.X. und Bock, R. (2008b) Rpl33, a nonessential plastid-encoded ribosomal protein in tobacco, is required under cold stress conditions. *The Plant cell*, 20, 2221-2237.
- Rowley, M.J., Bohmdorfer, G. und Wierzbicki, A.T. (2013) Analysis of long non-coding RNAs produced by a specialized RNA polymerase in *Arabidopsis thaliana*. *Methods*, 63, 160-169.
- Ruwe, H., Kupsch, C., Teubner, M. und Schmitz-Linneweber, C. (2011) The RNA-recognition motif in chloroplasts. *Journal of plant physiology*, 168, 1361-1371.
- Sager, R. und Ishida, M.R. (1963) Chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 50, 725-730.
- Sakai, A., Saito, C., Inada, N. und Kuroiwa, T. (1998) Transcriptional activities of the chloroplast-nuclei and proplastid-nuclei isolated from tobacco exhibit different sensitivities to tagetitoxin: implication of the presence of distinct RNA polymerases. *Plant & cell physiology*, 39, 928-934.
- Sakai, A., Takano, H. und Kuroiwa, T. (2004) Organelle nuclei in higher plants: structure, composition, function, and evolution. *International review of cytology*, 238, 59-118.
- Sakai, A., Yamashita, H., Nemoto, Y., Kawano, S. und Kuroiwa, T. (1991) Transcriptional Activity of Morphologically Intact Proplastid-Nuclei (Nucleoids) Isolated from Tobacco Cultured Cells. *Plant and Cell Physiology*, 32, pp. 835-843.
- Salone, V., Rudinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V. und Lurin, C. (2007) A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS letters*, 581, 4132-4138.
- Salvador, M.L., Klein, U. und Bogorad, L. (1993) Light-regulated and endogenous fluctuations of chloroplast transcript levels in *Chlamydomonas*. Regulation by transcription and RNA degradation. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 3, 213-219.
- Sambrook J. und Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: Laboratory Manual Band 1 to Band 3* 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sato, N. (2001) Was the evolution of plastid genetic machinery discontinuous? *Trends in plant science*, 6, 151-155.
- Sato, N., Albrieux, C., Joyard, J., Douce, R. und Kuroiwa, T. (1993) Detection and characterization of a plastid envelope DNA-binding protein which may anchor plastid nucleoids. *The EMBO journal*, 12, 555-561.
- Sato, N., Ohshima, K., Watanabe, A., Ohta, N., Nishiyama, Y., Joyard, J. und Douce, R. (1998) Molecular characterization of the PEND protein, a novel bZIP protein present in the envelope membrane that is the site of nucleoid replication in developing plastids. *The Plant cell*, 10, 859-872.
- Sato, N., Rolland, N., Block, M.A. und Joyard, J. (1999a) Do plastid envelope membranes play a role in the expression of the plastid genome? *Biochimie*, 81, 619-629.
- Sato, N., Terasawa, K., Miyajima, K. und Kabeya, Y. (2003) Organization, developmental dynamics and evolution of plastid nucleoids. *International review of cytology*, 232, 217-262.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E. und Tabata, S. (1999b) Complete structure of the chloroplast genome of *Arabidopsis thaliana*. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 6, 283-290.
- Scharff, L.B., Childs, L., Walther, D. und Bock, R. (2011) Local absence of secondary structure permits translation of mRNAs that lack ribosome-binding sites. *PLoS genetics*, 7, e1002155.
- Schmitz-Linneweber, C. und Barkan, A. (2007) RNA splicing and RNA editing in chloroplasts. In *Cell and Molecular Biology of Plastids*. (Bock, R. ed. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 213-248.
- Schmitz-Linneweber, C., Kushnir, S., Babiychuk, E., Poltnigg, P., Herrmann, R.G. und Maier, R.M. (2005a) Pigment Deficiency in Nightshade/Tobacco Cybrids Is Caused by the Failure to Edit the Plastid ATPase alpha-Subunit mRNA. *The Plant cell*, 17, 1815-1828.
- Schmitz-Linneweber, C. und Small, I. (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends in plant science*, 13, 663-670.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2005b) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *The Plant cell*, 17, 2791-2804.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., Williams, P., Kroeger, T., Vichas, A. und Barkan, A. (2006) A pentatricopeptide repeat protein binds to and facilitates

- the *trans*-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *The Plant cell*, 18, 2650-2663.
- Schroter, Y., Steiner, S., Matthai, K. und Pfannschmidt, T. (2010) Analysis of oligomeric protein complexes in the chloroplast sub-proteome of nucleic acid-binding proteins from mustard reveals potential redox regulators of plastid gene expression. *Proteomics*, 10, 2191-204.
- Schwacke, R., Fischer, K., Ketelsen, B., Krupinska, K. und Krause, K. (2007) Comparative survey of plastid and mitochondrial targeting properties of transcription factors in Arabidopsis and rice. *Molecular genetics and genomics* : MGG, 277, 631-646.
- Schweer, J., Turkeri, H., Kolpack, A. und Link, G. (2010) Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription - recent lessons from Arabidopsis thaliana. *European journal of cell biology*, 89, 940-946.
- Sellden, G. und Leech, R.M. (1981) Localization of DNA in Mature and Young Wheat Chloroplasts Using the Fluorescent Probe 4'-6-Diamidino-2-phenylindole. *Plant physiology*, 68, 731-734.
- Selth, L.A., Sigurdsson, S. und Svejstrup, J.Q. (2010) Transcript Elongation by RNA Polymerase II. *Annual review of biochemistry*, 79, 271-293.
- Severinov, K., Mustaev, A., Kukarin, A., Muzzin, O., Bass, I., Darst, S.A. und Goldfarb, A. (1996) Structural modules of the large subunits of RNA polymerase. Introducing archaeobacterial and chloroplast split sites in the beta and beta' subunits of Escherichia coli RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry*, 271, 27969-27974.
- Sexton, T.B., Christopher, D.A. und Mullet, J.E. (1990) Light-induced switch in barley psbD-psbC promoter utilization: a novel mechanism regulating chloroplast gene expression. *The EMBO journal*, 9, 4485-4494.
- Shiina, T., Tsunoyama, Y., Nakahira, Y. und Khan, M.S. (2005) Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *International review of cytology*, 244, 1-68.
- Shikanai, T. und Fujii, S. (2013) Function of PPR proteins in plastid gene expression. *RNA biology*, 10.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chunwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. und Sugiura, M. (1986) The complete nucleotide sequence of tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.*, 5, 2043-2049.

- Silhavy, D. und Maliga, P. (1998) Mapping of promoters for the nucleus encoded plastid RNA polymerase (NEP) in the *iojap* maize mutant. *Curr. Genet.*, 33, 340-344.
- Sims, R.J., 3rd, Mandal, S.S. und Reinberg, D. (2004) Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Current opinion in cell biology*, 16, 263-271.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology*, 98, 503-517.
- Sriraman, P., Silhavy, D. und Maliga, P. (1998) Transcription from heterologous rRNA operon promoters in chloroplasts reveals requirement for specific activating factors. *Plant physiology*, 117, 1495-1499.
- Steiner, S., Dietzel, L., Schroter, Y., Fey, V., Wagner, R. und Pfannschmidt, T. (2009) The role of phosphorylation in redox regulation of photosynthesis genes *psaA* and *psbA* during photosynthetic acclimation of mustard. *Molecular plant*, 2, 416-429.
- Steiner, S., Schroter, Y., Pfalz, J. und Pfannschmidt, T. (2011) Identification of essential subunits in the plastid-encoded RNA polymerase complex reveals building blocks for proper plastid development. *Plant physiology*, 157, 1043-1055.
- Stern, D.B., Goldschmidt-Clermont, M. und Hanson, M.R. (2010) Chloroplast RNA metabolism. *Annual review of plant biology*, 61, 125-155.
- Stern, D.B. und Gruissem, W. (1987) Control of plastid gene expression: 3' inverted repeats act as mRNA processing and stabilizing elements, but do not terminate transcription. *Cell*, 51, 1145-1157.
- Stoppel, R. und Meurer, J. (2013) Complex RNA metabolism in the chloroplast: an update on the *psbB* operon. *Planta*, 237, 441-449.
- Suck, R., Zeltz, P., Falk, J., Acker, A., Kössel, H. und Krupinska, K. (1996) Transcriptionally active chromosomes (TACs) of barley chloroplasts contain the alpha-subunit of plastome-encoded RNA polymerase. *Current genetics*, 30, 515-521.
- Sugita, M. und Sugiura, M. (1996) Regulation of gene expression in chloroplasts of higher plants. *Plant molecular biology*, 32, 315-326.
- Sugiura, M. (1992) The chloroplast genome. *Plant molecular biology*, 19, 149-168.
- Sugiura, M. (1995) The chloroplast genome. *Essays Biochem*, 30, 49-57.
- Sugiura, M., Hirose, T. und Sugita, M. (1998a) Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annual review of genetics*, 32, 437-459.

- Sugiura, M., Hirose, T. und Sugita, M. (1998b) Evolution and mechanisms for translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genet.*, 32, 437-459.
- Suzuki, J.Y., Jimmy Ytterberg, A., Beardslee, T.A., Allison, L.A., Wijk, K.J. und Maliga, P. (2004) Affinity purification of the tobacco plastid RNA polymerase and in vitro reconstitution of the holoenzyme. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 40, 164-172.
- Suzuki, J.Y., Sriraman, P., Svab, Z. und Maliga, P. (2003) Unique architecture of the plastid ribosomal RNA operon promoter recognized by the multisubunit RNA polymerase in tobacco and other higher plants. *The Plant cell*, 15, 195-205.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. und Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 8526-8530.
- Svab, Z. und Maliga, P. (1993) High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 913-917.
- Tan, S. und Troxler, R.F. (1999) Characterization of two chloroplast RNA polymerase sigma factors from *Zea mays*: photoregulation and differential expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 5316-5321.
- Thelen, J.J. und Ohlrogge, J.B. (2002) The multisubunit acetyl-CoA carboxylase is strongly associated with the chloroplast envelope through non-ionic interactions to the carboxyltransferase subunits. *Archives of biochemistry and biophysics*, 400, 245-257.
- Thum, K.E., Kim, M., Christopher, D.A. und Mullet, J.E. (2001) Cryptochrome 1, cryptochrome 2, and phytochrome a co-activate the chloroplast *psbD* blue light-responsive promoter. *The Plant cell*, 13, 2747-2760.
- Till, B., Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. und Barkan, A. (2001) CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. *Rna*, 7, 1227-1238.
- Tiller, K. und Link, G. (1993) Phosphorylation and dephosphorylation affect functional characteristics of chloroplast and etioplast transcription systems from mustard (*Sinapis alba* L.). *The EMBO journal*, 12, 1745-1753.
- Tillich, M., Hardel, S.L., Kupsch, C., Armbruster, U., Delannoy, E., Gualberto, J.M., Lehwark, P., Leister, D., Small, I.D. und Schmitz-Linneweber, C. (2009) Chloroplast ribonucleoprotein CP31A is required for editing and stability of specific chloroplast mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6002-6007.
- Tillich, M., Lehwark, P., Morton, B.R. und Maier, U.G. (2006) The evolution of chloroplast RNA editing. *Mol Biol Evol*, 23, 1912-1921.

- Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y. und Martin, W. (2004) Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature reviews. Genetics*, 5, 123-135.
- Tsunoyama, Y., Ishizaki, Y., Morikawa, K., Kobori, M., Nakahira, Y., Takeba, G., Toyoshima, Y. und Shiina, T. (2004) Blue light-induced transcription of plastid-encoded psbD gene is mediated by a nuclear-encoded transcription initiation factor, AtSig5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 3304-3309.
- Tullberg, A., Alexciev, K., Pfannschmidt, T. und Allen, J.F. (2000) Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psaB* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool. *Plant & cell physiology*, 41, 1045-1054.
- Van Aken, O. und Whelan, J. (2012) Comparison of transcriptional changes to chloroplast and mitochondrial perturbations reveals common and specific responses in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 3, 281.
- Vassilyev, D.G. (2009) Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Current opinion in structural biology*, 19, 691-700.
- Vassilyev, D.G., Vassilyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H. und Artsimovitch, I. (2007) Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, 448, 157-162.
- Voelker, R. und Barkan, A. (1995) Two nuclear mutations disrupt distinct pathways for targeting proteins to the chloroplast thylakoid. *The EMBO journal*, 14, 3905-3914.
- Vogel, J. und Hess, W.R. (2001) Complete 5' and 3' end maturation of group II intron-containing tRNA precursors. *RNA*, 7, 285-292.
- Wade, J.T., Struhl, K., Busby, S.J. und Grainger, D.C. (2007) Genomic analysis of protein-DNA interactions in bacteria: insights into transcription and chromosome organization. *Molecular microbiology*, 65, 21-26.
- Wagner, R. und Pfannschmidt, T. (2006) Eukaryotic transcription factors in plastids--Bioinformatic assessment and implications for the evolution of gene expression machineries in plants. *Gene*, 381, 62-70.
- Waters, M. und Pyke, K. (2004) Plastid Development and Differentiation. *Moller, S.G. (ed.) Plastids. Blackwell, Oxford*, 30-59.
- Watkins, K.P., Rojas, M., Friso, G., van Wijk, K.J., Meurer, J. und Barkan, A. (2011) APO1 promotes the splicing of chloroplast group II introns and harbors a plant-specific zinc-dependent RNA binding domain. *The Plant cell*, 23, 1082-1092.

- Weihe, A. (2004) The transcription of plant organelle genomes. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles. Chloroplasts and Mitochondria*. (Daniell, H. und Chase, C. eds). Dordrecht: Springer, pp. 213-237.
- Weihe, A. und Börner, T. (1999) Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends in plant science*, 4, 169-170.
- Weihe, A., Liere, K. und Börner, T. (2012) Transcription and transcription regulation in chloroplast and mitochondria of higher plants. . In *Organelle Genetics: Evolution of Organelle Genomes and Genexpression* (Bullerwell, C. ed. Berlin-Heidelberg: Springer, pp. 297-325.
- Williams-Carrier, R., Zoschke, R., Belcher, S., Pfalz, J. und Barkan, A. (2013) A major role for the plastid-encoded RNA polymerase complex in the expression of plastid tRNAs. *Plant physiology*.
- Wintz, H. und Hanson, M.R. (1991) A termination codon is created by RNA editing in the petunia atp9 transcript. *Current genetics*, 19, 61-64.
- Wolf, P.G., Rowe, C.A. und Hasebe, M. (2004) High levels of RNA editing in a vascular plant chloroplast genome: analysis of transcripts from the fern *Adiantum capillus-veneris*. *Gene*, 339, 89-97.
- Woodson, J.D. und Chory, J. (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nature reviews. Genetics*, 9, 383-395.
- Wu, J., Smith, L.T., Plass, C. und Huang, T.H. (2006) ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. *Cancer research*, 66, 6899-6902.
- Yagi, Y., Ishizaki, Y., Nakahira, Y., Tozawa, Y. und Shiina, T. (2012) Eukaryotic-type plastid nucleoid protein pTAC3 is essential for transcription by the bacterial-type plastid RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 7541-7546.
- Yagi, Y. und Shiina, T. (2012) Evolutionary aspects of plastid proteins involved in transcription: the transcription of a tiny genome is mediated by a complicated machinery. *Transcription*, 3, 290-294.
- Yamaguchi, K. und Subramanian, A.R. (2003) Proteomic identification of all plastid-specific ribosomal proteins in higher plant chloroplast 30S ribosomal subunit. *European journal of biochemistry / FEBS*, 270, 190-205.
- Yamaguchi, K., von Knoblauch, K. und Subramanian, A.R. (2000) The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30 S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). *The Journal of biological chemistry*, 275, 28455-28465.
- Yao, W.B., Meng, B.Y., Tanaka, M. und Sugiura, M. (1989) An additional promoter within the protein-coding region of the psbD-psbC gene cluster in tobacco chloroplast DNA. *Nucleic acids research*, 17, 9583-9591.

- Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M. und Schuster, G. (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. *Molecular and cellular biology*, 21, 5408-5416.
- Yu, Q.B., Lu, Y., Ma, Q., Zhao, T.T., Huang, C., Zhao, H.F., Zhang, X.L., Lv, R.H. und Yang, Z.N. (2013) TAC7, an essential component of the plastid transcriptionally active chromosome complex, interacts with FLN1, TAC10, TAC12 and TAC14 to regulate chloroplast gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant*, 148, 408-421.
- Zerges, W. (2000) Translation in chloroplasts. *Biochimie*, 82, 583-601.
- Zhao, Y.Y., Xu, T., Zucchi, P. und Bogorad, L. (1999) Subpopulations of chloroplast ribosomes change during photoregulated development of *Zea mays* leaves: ribosomal proteins L2, L21, and L29. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8997-9002.
- Zhelyazkova, P., Sharma, C.M., Forstner, K.U., Liere, K., Vogel, J. und Börner, T. (2012) The primary transcriptome of barley chloroplasts: numerous noncoding RNAs and the dominating role of the plastid-encoded RNA polymerase. *The Plant cell*, 24, 123-136.
- Zhong, L., Zhou, W., Wang, H., Ding, S., Lu, Q., Wen, X., Peng, L., Zhang, L. und Lu, C. (2013) Chloroplast Small Heat Shock Protein HSP21 Interacts with Plastid Nucleoid Protein pTAC5 and Is Essential for Chloroplast Development in *Arabidopsis* under Heat Stress. *The Plant cell*.
- Zhou, W., Cheng, Y., Yap, A., Chateigner-Boutin, A.L., Delannoy, E., Hammani, K., Small, I. und Huang, J. (2009) The *Arabidopsis* gene YS1 encoding a DYW protein is required for editing of *rpoB* transcripts and the rapid development of chloroplasts during early growth. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 58, 82-96.
- Zoschke, R., Kroeger, T., Belcher, S., Schottler, M.A., Barkan, A. und Schmitz-Linneweber, C. (2012) The pentatricopeptide repeat-SMR protein ATP4 promotes translation of the chloroplast *atpB/E* mRNA. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 72, 547-558.
- Zoschke, R., Liere, K. und Börner, T. (2007) From seedling to mature plant: *arabidopsis* plastidial genome copy number, RNA accumulation and transcription are differentially regulated during leaf development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 50, 710-722.
- Zoschke, R., Nakamura, M., Liere, K., Sugiura, M., Börner, T. und Schmitz-Linneweber, C. (2010) An organellar maturase associates with multiple group II introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3245-3250.

Anhang 1

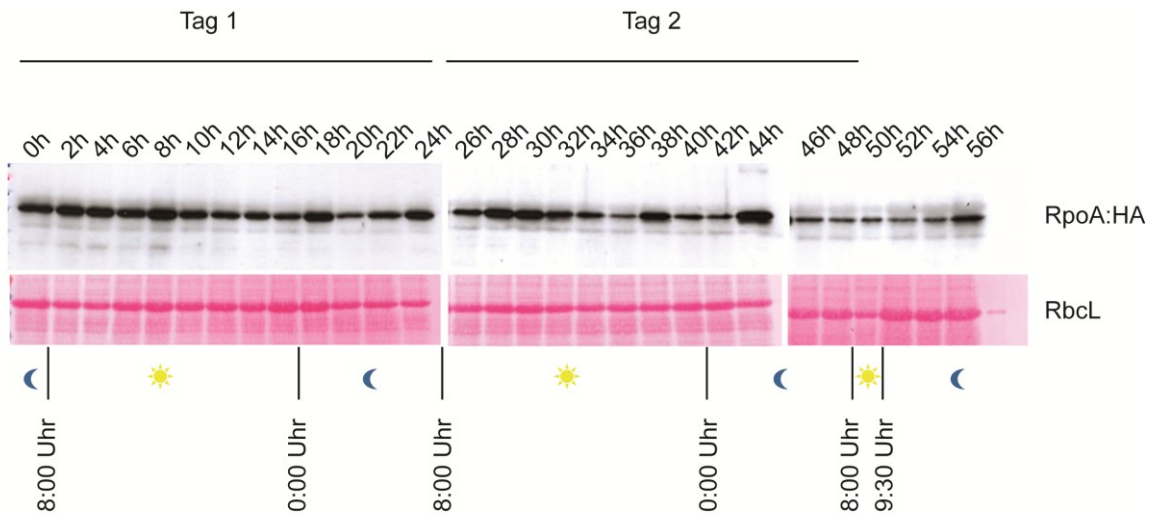


Abb. 30: Zirkadiane Expression des rekombinanten RpoA:HA Proteins über einen Zeitraum von 56 Stunden. Sieben Tage alte Tabakpflanzen wurden unter Standardbedingungen angezogen und in einem Abstand von zwei Stunden geerntet. Gleiche Mengen von Gesamtproteinextrakten wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit einem spezifischen HA-Antikörper (Sigma) hybridisiert. Oben: Immunologische Detektion von RpoA:HA. Unten: Die gleichen Membranen wurden mit Ponceau S gefärbt und ein Ausschnitt ist als Beladungskontrolle gezeigt. Die Sonne symbolisiert die Lichtperiode und der Halbmond die Dunkelperiode. Zeiten zu denen das Licht an- bzw. ausgeschaltet wurde sind unterhalb der Membranen gekennzeichnet. Nach 48 Stunden erfolgte eine kurze Belichtung für anderthalb Stunden und anschließend wurden die Pflanzen erneut einer Dunkelperiode ausgesetzt. RbcL = RuBisCo, h = Stunden.

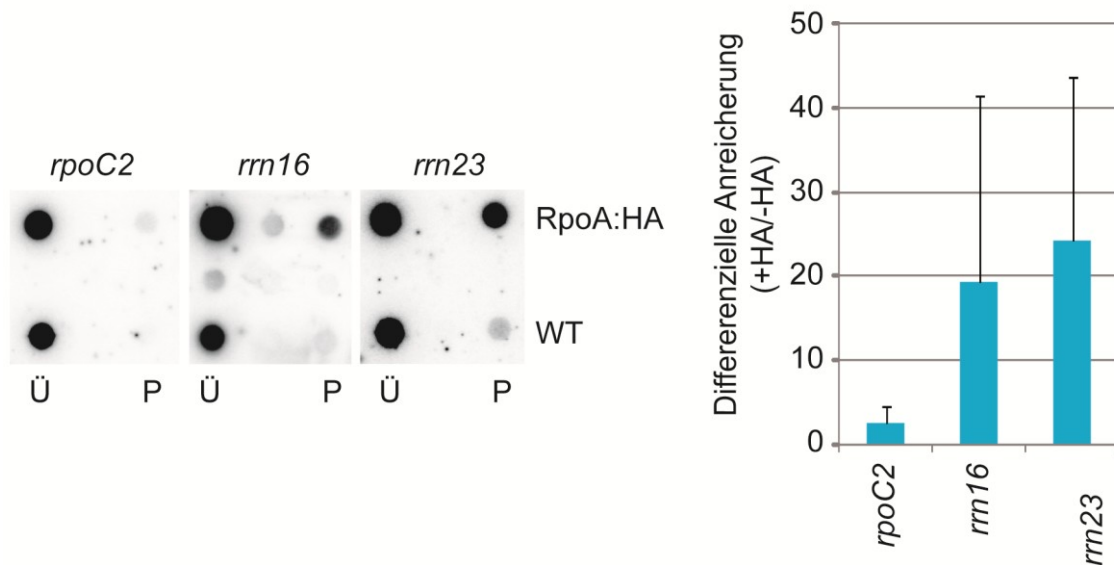


Abb. 31: Dotblot Hybridisierungen von RpoA:HA copräzipitierter DNA in reifen Chloroplasten. RpoA:HA wurde aus solubilisierten Chloroplastenmembranen 60 Tage alter, bereits blühender Pflanzen immunopräzipitiert. Kontroll-IPs von WT Pflanzen gleichen Alters wurden parallel analysiert. Die DNA wurde aus Pellet- (P) und Überstandsfractionen (Ü) isoliert und auf Nylonmembranen transferiert. Links: Die Membran wurde mit den eingezeichneten PCR-Sonden hybridisiert. Rechts: Die Signale für zwei unabhängige Experimente wurden detektiert und quantifiziert (Phosphorimager und Quantity-One-Software, BioRad). Die differenzielle Anreicherung kennzeichnet den Quotienten von Pellet zu Überstand der epitopmarkierten Linie gegenüber den Quotienten der WT Linie (+HA/-HA). Zwei Experimente wurden zusammengefasst. Vertikale Linien zeigen die Standardabweichungen.

Anhang 2

Tabelle 1: Die 25 am stärksten angereicherten DNA-Abschnitte der *Microarray* Analyse unter Licht- und Dunkelbedingungen. RpoA:HA interagiert mit Photosynthesegenen, rRNA Genen und einigen tRNA Genen unter Lichtbedingungen. Unter Dunkelbedingungen gehören zu den 25 am stärksten angereicherten DNA-Bereichen auch Gene des NDH- und Cytochrome-*b₆f*-Komplexes. Hier kann also im Gegensatz zu den Lichtbedingungen keine Präferenz der PEP zu einer bestimmten Genklasse festgestellt werden.

	Name	Differenzielle Anreicherung Licht	Name	Differenzielle Anreicherung Dunkel
1	trnA(UGC)-Ex1-In	5.03	petL-petG-trnW(CCA)	3.89
2	trnI(GAU)-2	4.98	rbcL-3'UTR	3.81
3	trnI(GAU)-1	4.91	lg-rps12-orf131-orf70b	3.70
4	rrn23-4	4.90	rrn23-2	3.66
5	trnA(UGC)-In-Ex2	4.88	accD-5'	3.59
6	rrn23-2	4.67	psbD-3	3.50
7	rrn23-rrn4.5-2	4.65	rps2-rpoC2	3.48
8	psbD-1	4.63	trnV(UAC)-trnM(CAU)	3.48
9	rrn23-6	4.61	ndhF-3'-2	3.46
10	trnI(GAU)-trnA(UGC)	4.61	atpB-rbcL-5'UTR	3.46
11	psbC-3	4.60	ycf3-Ex1-orf74	3.46
12	psbD-4	4.60	trnV-trnM-atpE-3'UTR	3.45
13	trnI(GAU)-3	4.53	psaB-3	3.41
14	psbD-2	4.52	trnFM-rps14	3.36
15	rbcL-3	4.50	rrn16-3	3.33
16	psbA-3	4.48	lg-rpoB-trnC-2	3.32
17	psbA-3'	4.43	ndhI-ndhA-1	3.29
18	psbD-psbC	4.42	rbcL-5	3.29
19	psbD-5'UTR	4.38	petD-In-Ex2	3.24
20	trnV(UAC)-trnM(CAU)	4.34	lg-orf103-petL	3.24
21	psbC-2	4.33	rps15-ycf1-1	3.23
22	psbC-1	4.32	rpoB-3	3.23
23	rrn5-trnR(ACG)	4.31	psbB-psbT-1	3.20
24	rrn23-1	4.31	ndhA-Ex1-ndhH	3.19
25	rps14-psaB	4.28	trnP(UGG)-psaJ-1	3.18

Anhang 2

Tabelle 2: Die ersten 25 am stärksten angereicherten PCR-Produkte der RIP-Chip Analyse für Licht- und Dunkelbedingungen. RpoA:HA interagiert hauptsächlich mit tRNAs sowohl unter Licht- als auch Dunkelbedingungen. Weitere RpoA:HA assoziierte RNAs zählen zu dem *rrn* Operon wie z.B. *rrn16* und *rrn23*. Bei Licht ist *psbA* als einzige RNA des Photosynthesekomplexes unter den ersten 25 Treffern zu finden. Unter den Bedingungen in der Dunkelheit bleibt die Assoziation zu einigen tRNAs erhalten.

	Name	Differenzielle Anreicherung Licht	Name	Differenzielle Anreicherung Dunkel
	trnA(UGC)-Ex1-In	69.63	psbA-1	47.71
2	orf70A-trnL	64.00	trnV-trnM-atpE-3'UTR	41.21
3	trnV(UAC)-trnM(CAU)	54.41	psbA-2	37.78
4	trnI(GAU)-1	46.89	psbA-trnK	36.21
5	trnT(UGU)-orf70A	45.91	orf70A-trnL	34.50
6	trnG-In-Ex2	44.13	rbcL-3	32.54
7	psbA-1	41.02	atpB-rbcL-5'UTR	29.25
8	trnY-trnE-trnT	40.77	trnA(UGC)-Ex1-In	27.72
9	trnI(GAU)-trnA(UGC)	38.76	psbD-4	26.74
10	trnA(UGC)-In-Ex2	37.89	rbcL-5	26.26
11	trnV(GAC)-rrn16	35.73	psbD-3	24.00
12	trnI(GAU)-3	35.72	trnV(UAC)-trnM(CAU)	22.68
13	trnA(UGC)-In	32.29	rbcL-1	22.38
14	rrn16-3	31.43	psbC-2	22.17
15	trnV-trnM-atpE-3'UTR	31.09	trnA(UGC)-In-Ex2	22.11
16	rrn16-1	31.07	rrn16-3	20.47
17	rrn16-trnI-Ex1-1	30.58	trnI(GAU)-1	20.00
18	trnD-trnY-trnE-1	30.51	rrn23-rrn4.5-1	19.27
19	rrn16-2	30.14	petB-petD-Ex1-In	18.68
20	trnI(GAU)-2	28.74	psbD-5'UTR	18.06
21	trnE-trnT	28.18	trnG-Ex1-In	16.98
22	trnV(UAC)-In	27.03	rrn16-2	16.57
23	trnT-psbC	26.05	psaA-5'	16.43
24	trnL-1	25.75	trnV(GAC)-rrn16	15.93
25	rrn5-trnR(ACG)	24.15	trnG-In-Ex2	15.42

Anhang 2

Tabelle 3: Die 25 am stärksten angereicherten RNAs der *Microarray* Analyse für TACI- und TACII-assoziierte RNA. PCR-Produkte, die sich sowohl in TACI und in TACII unter den „Top25“ befinden, sind grün markiert.

	Name	Differenzielle Anreicherung TACI/ preTAC	Name	Differenzielle Anreicherung TACII/ preTAC
1	psaB-psaA	14.98	rpoC2-5	17.33
2	ycf2-10	14.18	psaB-psaA	16.48
3	rps2-rpoC2	12.01	psaB-2	15.28
4	psaA-5'	11.92	rpoC2-4	14.27
5	psaB-3	10.97	ycf2-2	13.33
6	matK-2	10.94	trnS(GGA)-rps4	12.85
7	atpl-rps2-3'UTR	10.67	rpoC2-rpoC1	12.71
8	rpoC2-2	10.57	ycf3-In1	12.66
9	ycf2-2	10.53	rpl14-rpl16-Ex2	12.47
10	trnS(GGA)-rps4	9.92	ycf2-9	12.26
11	ndhI-ndhA-2	9.77	psaB-3	11.89
12	ndhA-In-Ex1-1	9.66	psaA-1	11.71
13	ndhG	9.41	psaA-2	11.66
14	rps12-Ex1-5'UTR	9.18	ycf2-10	11.56
15	rpoC2-4	9.11	trnA(UGC)-rrn23-2	11.29
16	lg-rps12-orf131-orf70b	9.09	ycf2-5	11.18
17	ndhA-Ex2	9.03	rpoC1-In-Ex1-2	11.13
18	psaA-2	9.02	psaB-1	10.97
19	psaB-2	8.97	rps2-rpoC2	10.68
20	rps14-psaB-3'UTR	8.97	psaA-5'	10.54
21	ycf3-Ex2-In-Ex1	8.91	rpoC2-6	10.42
22	ndhI	8.89	rpoC2-1	10.14
23	psaB-1	8.88	psaA-3	10.12
24	rpoC1-rpoB-2	8.73	rpoC2-2	10.01
25	lg-rpoB-trnC-1	8.72	ycf10-petA	10.00

Anhang 2

Tabelle 4: Antikörperübersicht (AK = Antikörper, AS = Aminosäure, HA = Hämagglutinin. ID = Immunodetektion, IgG = Immunglobulin, IP = Immunopräzipitation, HRP = Meerrettichperoxidase)

Antikörper	Epitop/ Antigen (Organismus, Komplex)	Hersteller/ Bezugsquelle, Verwendung (Arbeitsverdünnung), Organismus
HA-AK	AS-Reste 98-106 (humanen Influenza Virus Hämagglutinin (HA))	Sigma (H3663), ID (1:1000), IP, Maus
HA-AK-HRP	AS-Reste 98-106 (humanen Influenza Virus Hämagglutinin (HA))	Sigma (H6533), ID nach IP (1:1000), Maus
PetD-AK	PetD (Cytochrom <i>b₅f</i> Komplex, <i>Zea mays</i>)	Prof. Dr. A. Barkan, ID (1:2000), Kaninchen
Mouse-HRP	IgG (Maus)	GE Healthcare (NXA931), ID (1:5000), Schaf
Rabbit-HRP	IgG (Kaninchen)	Sigma (A9169), ID (1:5000), Ziege

Tabelle 5: Anbieterliste von allen Unternehmen, von denen Materialien oder Softwareprogramme für diese Arbeit verwendet wurden.

Adobe	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Amersham Bioscience	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA
BANDELIN electronic	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
bsb11 biotech	bsb11 biotech service blu, Schauenburg, Deutschland
Colgate-Palmolive	Colgate-Palmolive GmbH, Gelsenkirchen, Deutschland
Corning	Corning Inc., Acton, MA, USA
CSHL	Cold Spring Harbor, NY, USA
Duchefa	Duchefa Biochemie B.V., Haarlem, Niederlande
DVD	Deutsche Vermiculite Dämmstoff-GmbH, Sprockhövel, Deutschland
Eurofins MWG Operon	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Fermentas	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Franz Eckert GmbH	Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland
frux	Einheitserde- und Humuswerke, Gebr. Patzer GmbH & Co. KG, Sinntal-Jossa, Deutschland
GE Healthcare	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
GenScript	GenScript, Piscataway, NJ 08854, USA
Hartmann Analytic	HARTMANN ANALYTIC GmbH, Braunschweig, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Invitrogen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Millipore	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
National Diagnostics	National Diagnostics U.S.A., Atlanta, Georgia 30336, USA
NEB	New England Biolabs, Ipswich, MA, US
neoLab	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

Anhang 2

Novagen	Merck Chemicals Ltd., Nottingham, Großbritannien
peqLab	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Percival Scientific	Percival Scientific, Perry, IA 50220 USA
PerkinElmer	PerkinElmer LAS (Deutschland) GmbH, Rodgau, Deutschland
Pharmacia Biotech	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
QIAGEN	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roth	C. Roth GMBH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Scotts	Scotts International B.V., Geldermalsen, Niederlande
Serva	Serva Feinbiochemika, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
SMB	Services in Molecular Biology GmbH, Rüdersdorf, Deutschland
Stratagene	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Thermo Scientific	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Whatman	Whatman Paper, Maidstone, Großbritannien

Tabelle 6: Übersicht der Oligonukleotide, die für die Herstellung von Sonden für Northern, Southern, Dotblot Analysen sowie für die reverse Transkription verwendet wurden. Außerdem sind alle für die Klonierung von *rpoA* bzw. *rpoC2-rps2* relevanten Primer aufgelistet. (Genotyp. = Genotypisierung, PCR = Polymerasekettenreaktion, RT-PCR = reverse Transkription mit anschließender PCR, Seq. = Sequenzierung). Die Oligonukleotide des Tabak Chloroplastengenom-*Tiling-Arrays* sind bei (Finster *et al.* 2013) gezeigt.

Name	Sequenz 5' -> 3'	Ziel	Anwendung
SFnt1for	ataagagataagaagaagtc	<i>psbA</i>	Dotblot, PCR
SFnt1rev	aggaagaaacttataacatcg	<i>psbA</i>	Dotblot, PCR
psbA fw	gaaagcgaaagcctatgggg	<i>psbA</i>	Dotblot, PCR
psbA rev	ctaagctcccactcacgaccc	<i>psbA</i>	Dotblot, PCR
rpoC2rev5	taatgttacgacacggatcg	<i>rpoC2</i>	Dotblot, PCR
S.rpoC2for	cggacggtataaatatttagca	<i>rpoC2</i>	Dotblot, PCR
ApsbD	tgaaccatttcatatgatg	<i>psbD</i>	Dotblot, PCR
AT7psbD	gtaatacgactcactatagggt agaacctcctcaggggaat	<i>psbD</i>	Dotblot, PCR
rbcl_fw	ggacaactgtatggaccgatgg	<i>rbcl</i>	Dotblot, PCR
rbcl_rev	ccgcaagacattcataaacagc	<i>rbcl</i>	Dotblot, PCR
Arrn16	ggtatctggggaataagcat	<i>rrn16</i>	Dotblot, PCR
AT7rrn16	gataatacgactcactatagg gttccaaactcaacgatgg	<i>rrn16</i>	Dotblot, PCR
rrn23_fw	ggatacctaggcaccagagacg	<i>rrn23</i>	Dotblot, PCR
rrn23_rev	cacgggattccacgtgcc	<i>rrn23</i>	Dotblot, PCR
Zagreb1	agagctaatacatataaccc	<i>ndhF</i>	Dotblot, PCR
AndhF	tacgggttgaattatggttc	<i>ndhF</i>	Dotblot, PCR
SF_rpoAforS	tgctgtattcatgcctgttcg	<i>rpoA</i>	Southern

Anhang 2

SF_rpoArevS	tggaaggcaattctgattgg	<i>rpoA</i>	Southern
EEpetDfor	cagaggataggctgggttcgc	<i>rpoA-petD</i>	Klonierung
EErpoAfor	ctgtaactgcccaagatatcatcttg	<i>rpoA-petD</i>	Klonierung
psbD_fw	gcccttggttaagtttacaaagacg	<i>psbD</i>	Northern
psbD_rev	ggagagcaacaaaagtccacagacc	<i>psbD</i>	Northern
atpFex2fw	cccaacatgccaatattggcactaatgg	<i>atpF</i>	Northern
atpFex2rev	cagaagaactgcgtggaggggc	<i>atpF</i>	Northern
atpFrevP	ttgtcggacttgattaatcg	<i>atpF</i>	reverse Transkription
AatpF	ttcgtttcttgggccactg	<i>atpF</i>	RT-PCR
atpF_In_fw	tccataatcccttcccgaacc	<i>atpF</i>	RT-PCR
atpF_In_rev	gacgcagcatggtactctttctacc	<i>atpF</i>	RT-PCR
SF_atpA-RT	atggaaattacattagtagg	<i>atpA</i>	reverse Transkription, RT-PCR, Seq.
SF_atpA for	gatggaatacactattgtgg	<i>atpA</i>	RT-PCR, Seq.
SF_atpA-nested	attgggtttcaactattgg	<i>atpA</i>	RT-PCR, Seq.
SF_ndhD-RT	tggaatgataacaaaatgc	<i>ndhD</i>	reverse Transkription, RT-PCR, Seq.
SF_ndhD for	gtgtccgagtttatttatgg	<i>ndhD</i>	RT-PCR, Seq.
SF_ndhD-nested	acatacatatcgtataccacc	<i>ndhD</i>	RT-PCR, Seq.
SF_rps14-RT	gcatgaaccatttcacgaag	<i>rps14</i>	reverse Transkription, RT-PCR, Seq.
SF_rps14 for	agaaatatcattcgattcg	<i>rps14</i>	RT-PCR, Seq.
SF_rps14-nested	tccaaagtctcgatagttagc	<i>rps14</i>	RT-PCR, Seq.
aadArevQ	gtgatctcgcctttcacgtag	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadAli	gaagcggttatcgccgaag	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
aadAoutfor	tatcagcccgtcacttgaagc	<i>aadA</i>	Genotyp., Seq.
M13rev	ggaaacagctatgaccatg	<i>pBluescript</i>	Genotyp., Seq.
M13-for	gtaaacgacggccagtg	<i>pBluescript</i>	Genotyp., Seq.
SF_HA-Tag for	ggactaccgggggactaagg ccttatgatgttctgattatgctgg	<i>HA-Tag</i>	Klonierung
SF_HA-Tag rev	ggactaccgggggactattata atcaggtacatcgtatggatatccagc	<i>HA-Tag</i>	Klonierung
HA-Tag_fw	ccttatgatgttctgattatgctgg	<i>HA-Tag</i>	Genotyp., Seq.
HA-Tag rev	ccagcataatcaggaacataaagg	<i>HA-Tag</i>	Genotyp., Seq.
Probe_C2neuFw	gctcgagtttagcaaaagc	<i>rpoC2</i>	Southern
Probe_C2neuRv	atcattaaatcctataaacgattg	<i>rpoC2</i>	Southern
Probe_s2 fw	aatcatcgttgatcagcacg	<i>rps2</i>	Southern
Probe_s2 rv	gctgaacctataaagatagc	<i>rps2</i>	Southern
SF_Acircle rev	attgttccgatggaaccttctcttc	<i>rpoC2, rps2</i>	Klonierung
SF_-Acircle for	tatttatttcagttcagggttcctcg	<i>rpoC2, rps2</i>	Klonierung
SF_C2 forSal	ggactgtcgactcgatagtatacg atcag	<i>rpoC</i>	Klonierung

Anhang 2

SF_S2 revSal	ggactgtcgacctctttgtctacttg aatc	<i>rps2</i>	Klonierung
SF_C2rev2	accagatccagaaccttttcgaattg aggatgtgacctccagatgaacctc cttttcaaattgaggatgagacca ggaatcattaaatcctataaacgattgttc	<i>rpoC2</i>	Klonierung
SF_S2for2	atctggatggtcacatcctcaattcgaaa aaggttctggatctggttgagtcacct caatttgaaaaataacaacggattcatc tctttcgc	<i>rps2</i>	Klonierung
SF_rps2HArev	atacatttctctccacacccccct	<i>rps2</i>	Klonierung
SF_rps2HAfor	tgctacaagaagatattggaacataatttg	<i>rps2</i>	Klonierung

Tabelle 7: RIP-Chip Wertetabelle für die Lichtexperimente zur Identifikation RpoA:HA assoziierter RNAs in Gesamtchloroplastenextrakten. Die graphische Darstellung ist in Abb. 19 zu finden.

Name	Replikate ¹ RpoA:HA	Replikate ¹ WT	Median ("Median of Ratios (635/532)") RpoA:HA ²	Median ("Median of Ratios (635/532)") WT ³	Differenzielle Anreicherung (+HA/-HA) ⁴ Licht	p-Wert ⁵
trnH	24	24	2.8165	0.231488565	23.76793249	1.64E-05
psbA-3'	24	20	7.887	0.69739593	22.09243697	8.15E-06
psbA-1	19	24	25.291	1.204326585	41.02351987	1.05E-05
psbA-2	24	24	15.6615	1.51200126	20.23449612	5.17E-06
psbA-3	24	13	14.9165	1.71125724	17.02796804	2.62E-06
psbA- trnK	24	24	11.6005	1.55107106	14.61020151	3.41E-06
matK-3'	12	7	4.835			1.11E-06
matK-1	22	20	2.917	0.87516352	6.511160714	4.88E-06
matK-2	24	17	3.991	0.67200056	11.60174419	0
matK-3	22	20	1.885	0.803861135	4.580801944	4.25E-07
matK-4	23	19	2.07	0.77358204	5.227272727	1.82E-10
matK-5'UTR	22	18	3.4195	0.74427969	8.975065617	8.20E-09
trnK-5'-1	17	19	2.443	0.77553553	6.153652393	2.26E-09
trnK-5'-2	24	23	1.552	0.39460498	7.683168317	8.08E-12
rps16-3'	23	16	0.689	0.612419115	2.197767145	1.72E-05
rps16-Ex2- ln	23	17	0.569	0.98065198	1.133466135	0.43323827
rps16-ln	6	10		0.803861135		0.09805789
rps16-5'	24	20	2.4225	1.04121017	4.545028143	4.73E-08
lg-trnQ-3'	12	8	5.7355	0.79311694	14.12684729	1.33E-15
trnQ-psbK	24	24	3.35	0.274465345	23.84341637	5.78E-05
psbK-psbI- trnS	22	24	0.843	0.594837705	2.768472906	2.23E-05
lg-trnG- 5'UTR	17	15	1.796	0.59776794	5.869281046	5.11E-05
trnG-Ex1-ln	24	23	8.077	0.92986124	16.96848739	1.24E-07
trnG-ln	23	7	4.94			1.26E-08
trnG-ln-Ex2	23	23	5.119	0.22660484	44.12931034	4.34E-06
trnG-trnR	24	21	2.2175	0.36920961	11.73280423	3.00E-06

Anhang 2

trnR-atpA	15	18	2.601	1.092977655	4.648793566	3.66E-07
atpA-1	9	8	1.752	0.86930305	3.937078652	0.0788255
atpA-2	24	22	0.637	0.68762848	1.809659091	0.0859189
atpA-atpF	16	12	0.793	1.12521024	1.376736111	0.02227205
atpF-Ex2	19	19	1.032	0.70911687	2.842975207	2.34E-04
atpF-Ex2-In	7	18		0.946465905		0.24856886
atpF-In-Ex1	15	24	1.179	0.606558645	3.797101449	4.64E-14
atpF-In	8	14	2.13	0.880047245	4.728079911	0.04699385
atpF-atpH	13	15	0.559	0.49227948	2.218253968	0.09881172
atpH	24	23	1.43	0.51767485	5.396226415	1.95E-13
Ig-atpH-atpI	15	17	0.538	0.61730284	1.702531646	0.02349508
atpI	5	19		0.63488425		0.09437211
atpI-rps2-3'UTR	21	23	1.038	0.67786103	2.991354467	1.17E-05
rps2-1	5	24		0.73646573		0.19147031
rps2-2	13	12	0.656	0.504977165	2.537717602	0.43974706
rps2-rpoC2	12	13	0.5255	0.45125619	2.274891775	0.83197531
rpoC2-1	22	24	0.436	0.540139985	1.576853526	2.36E-04
rpoC2-2	19	14	0.531	0.626093545	1.656786271	0.00146973
rpoC2-3	15	22	0.378	0.520605085	1.418386492	0.45446272
rpoC2-4	24	22	0.3465	0.45907015	1.474468085	1.81E-05
rpoC2-5	12	13	0.6555	0.78530298	1.630597015	0.06361431
rpoC2-6	15	23	0.399	0.81851231	0.952267303	0.37702979
rpoC2-rpoC1	12	22	0.343	0.75404714	0.888601036	0.53175664
rpoC1-Ex2-In	18	12	0.396	0.86148909	0.897959184	0.2994373
rpoC1-In	12	18	0.3505	0.59972143	1.141693811	0.30457433
rpoC1-In-Ex1-1	1	2				-1
rpoC1-In-Ex1-2	23	24	0.569	0.72669828	1.529569892	5.99E-04
rpoC1-rpoB-1	18	24	0.552	0.694465695	1.552742616	0.01092338
rpoC1-rpoB-2	23	22	0.494	0.65051217	1.483483483	6.15E-05
rpoB-1	22	18	0.4705	0.59386096	1.547697368	0.06242074
rpoB-2	15	21	0.499	0.82437278	1.182464455	0.18224432
rpoB-3	24	21	0.4735	0.72474479	1.276280323	0.04582322
rpoB-5'	23	23	0.585	0.47274458	2.417355372	0.14939227
Ig-rpoB-trnC-1	24	22	1.804	0.53134928	6.632352941	3.11E-15
Ig-rpoB-trnC-2	9	2	1.827			0.41252654
trnC-petN	24	18	2.009	0.596791195	6.576104746	2.57E-12
petN	6	5				0.11616411
petN-psbM	9	12	2.568	1.165256785	4.30511316	7.20E-04
psbM-5'UTR	5	0				-1
trnD-3'UTR	23	24	3.223	0.60753539	10.36334405	2.35E-07
trnD-trnY-trnE-1	24	24	3.463	0.221721115	30.51101322	1.43E-05
trnD-trnY-trnE-2	24	24	3.051	0.29107001	20.47651007	1.60E-05
trnY-trnE-trnT	24	24	3.343	0.16018618	40.76829268	8.00E-06

Anhang 2

trnE-trnT	24	24	2.733	0.18948853	28.17525773	1.34E-06
trnT-5'UTR	13	12	4.016	0.540139985	14.5244123	4.88E-11
trnT-psbC	24	24	2.6045	0.195349	26.045	1.47E-05
psbD-5'UTR	24	24	4.8495	0.72083781	13.14227642	1.58E-06
psbD-1	24	18	3.0625	0.6446517	9.28030303	8.33E-06
psbD-2	20	13	5.8325	0.80288439	14.19099757	3.76E-06
psbD-3	24	23	3.482	0.50400042	13.49612403	3.09E-06
psbD-4	24	24	4.848	0.71302385	13.28219178	2.76E-06
psbD-psbC	24	24	2.65	0.546000455	9.481216458	1.00E-06
psbC-1	24	23	4.4495	0.66027962	13.16420118	5.87E-06
psbC-2	24	24	4.575	1.120326515	7.977332171	2.67E-06
psbC-3	23	10	1.703	1.17014051	2.843071786	8.83E-06
psbC-trnS	24	19	2.026	0.53134928	7.448529412	1.83E-07
trnS-orf105	24	19	1.923	0.22660484	16.57758621	7.60E-06
orf105-psbZ	24	18	2.86	0.657349385	8.499257058	1.32E-06
psbZ-trnG-trnfM	24	18	4.012	0.38483753	20.36548223	4.70E-07
trnfM-rps14	24	24	1.8695	0.20120947	18.15048544	3.24E-05
rps14-psaB-3'UTR	24	23	6.8865	0.56846559	23.66494845	1.95E-07
rps14-psaB	24	23	3.483	0.66809358	10.18421053	2.07E-06
psaB-1	24	20	3.4985	1.11153581	6.148506151	1.41E-06
psaB-2	17	19	3.781	0.91423332	8.079059829	5.62E-06
psaB-3	24	22	2.4715	0.719861065	6.706919946	3.25E-06
psaB-4	24	23	3.8225	0.71888432	10.38722826	7.24E-07
psaB- psaA	24	24	3.066	0.952326375	6.289230769	1.32E-06
psaA-1	19	23	2.517	0.75795412	6.487113402	4.08E-06
psaA-2	12	19	4.6865	0.60948888	15.02083333	3.26E-06
psaA-3	22	18	3.37	0.68567499	9.601139601	4.35E-06
psaA-5'	24	24	5.4175	0.784326235	13.49315068	1.59E-07
lg-psaA-ycf3	23	7	2.642			2.46E-05
ycf3-EX3-ln2	1	14		0.67786103		-1
ycf3-ln2	19	9	0.647	1.43972213	0.877883311	0.11568232
ycf3-ln2-Ex2	13	11	1.241	0.64660519	3.749244713	5.78E-09
ycf3-ln1	21	9	0.717	0.9572101	1.463265306	0.03155087
ycf3-Ex2-ln-Ex1	24	24	0.6785	0.512791125	2.584761905	1.40E-09
ycf3-Ex1-orf74	24	21	0.8665	0.66223311	2.556047198	5.85E-06
orf74-trnS(GGA)	24	12	1.321	0.450279445	5.731019523	2.08E-09
trnS(GGA)-rps4	22	19	1.933	0.74427969	5.073490814	6.43E-11
rps4-trnT(UGU)	17	13	1.945	0.55869814	6.800699301	1.46E-06
trnT(UGU)-orf70A	23	22	3.696	0.157255945	45.91304348	2.67E-05
orf70A-trnL	23	24	15.072	0.460046895	64	2.39E-09
trnL-1	24	24	4.481	0.33990726	25.75287356	4.74E-06
trnL-2	24	21	2.509	0.53525626	9.156934307	2.28E-06
trnL-ln	24	16	8.805	1.512978005	11.36862492	6.36E-07

Anhang 2

lg-trnL-ndhJ	12	13	2.8475	0.81265184	6.844951923	9.73E-06
ndhJ	23	20	0.883	0.653442405	2.639760837	7.13E-05
ndhJ-ndhK	17	12	2.431	0.72474479	6.552560647	2.15E-06
ndhK-ndhC	23	21	2.581	0.74037271	6.810026385	1.80E-08
ndhC-5'UTR	24	9	5.6015	1.06855903	10.24040219	7.20E-09
trnV(UAC)-3'UTR	24	23	5.176	0.45711666	22.11965812	3.14E-09
trnV(UAC)-ln	24	13	10.354	0.74818667	27.03394256	5.79E-10
trnV(UAC)-trnM(CAU)	23	24	7.236	0.25981417	54.40601504	6.23E-07
trnV-trnM-atpE-3'UTR	24	21	12.778	0.80288439	31.09002433	8.13E-13
trnM(CAU)-atpE	23	13	2.454	0.71693083	6.686648501	9.01E-07
atpE	24	9	2.7995	0.94744265	5.772164948	1.33E-09
atpE-atpB	24	24	1.55	0.5274423	5.740740741	9.12E-10
atpB-1	24	10	0.7325	1.13497769	1.260757315	0.24921834
atpB-2	24	24	0.8305	0.58800049	2.759136213	6.65E-08
atpB-3	17	13	0.825	0.84390768	1.909722222	0.02838172
atpB-5'UTR	22	13	2.053	0.83609372	4.796728972	1.26E-06
atpB-rbcL-5'UTR	24	22	8.3005	2.08046685	7.793896714	6.56E-09
rbcL-1	24	24	10.964	1.56669898	13.67082294	4.52E-06
rbcL-2	20	23	11.502	0.96111708	23.37804878	1.43E-06
rbcL-3	24	23	5.668	0.71693083	15.44414169	1.56E-06
rbcL-4	14	16	10.4585	1.58037341	12.9276885	4.65E-08
rbcL-5	24	24	4.644	0.93572171	9.69519833	1.10E-07
rbcL- 3'UTR	21	13	3.887	0.69153546	10.98022599	4.33E-09
accD-5'	23	18	3.602	0.631954015	11.13446677	3.00E-09
accD	13	12	2.352	0.581163275	7.905882353	1.98E-10
accD-3'-orf71A	22	12	1.8915	0.7618611	4.85	5.35E-07
orf71A-psaI	24	8	1.3705	1.06269856	2.519301471	8.83E-05
psaI-ycf4	23	23	0.864	0.57823304	2.918918919	4.77E-14
ycf4-ycf10	11	11	1.518	0.75404714	3.932642487	1.74E-06
ycf10-1	12	11	2.139	1.00604735	4.153398058	0.01345313
ycf10-petA	13	22	0.875	0.58214002	2.936241611	7.12E-05
petA	24	24	0.7565	0.624140055	2.367762128	3.44E-07
petA-3'UTR-orf99	9	15	0.68	0.82437278	1.611374408	0.33011688
orf99-psbJ-psbL	14	11	0.8305	0.71302385	2.275342466	0.00828044
psbL-psbF-psbE	24	16	2.8785	0.909349595	6.183673469	3.38E-05
psbE	23	17	3.033	0.81069835	7.308433735	6.27E-07
psbE-orf103	24	19	2.902	0.90641936	6.254310345	4.32E-06
orf103-5'	12	2	1.278			0.00785884
lg-orf103-petL	13	13	0.653	0.62707029	2.034267913	0.03384938
petL-petG-trnW(CCA)	18	19	0.3125	0.16409316	3.720238095	0.01243546

Anhang 2

petG-trnW(CCA)-trnP(UGG)	24	24	1.6735	0.34186075	9.562857143	3.37E-06
trnP(UGG)-psaJ-1	24	20	1.696	0.33404679	9.918128655	1.39E-05
trnP(UGG)-psaJ-2	24	24	1.3655	0.180697825	14.76216216	1.30E-05
psaJ-rpl33	19	12	1.197	0.91227983	2.563169165	1.01E-05
rpl33-rps18	22	23	0.992	0.93572171	2.070981211	6.08E-05
rps18-rpl20	15	10	1.796	1.221907995	2.871302958	3.08E-04
rpl20-5'UTR	19	11	0.839	0.81851231	2.002386635	0.01194549
rps12-3'UTR	17	13	0.619	1.04902413	1.152700186	0.72373709
clpP-In2	18	10	0.5525	1.032419465	1.045411542	0.66772919
rps12-clpP-In2	15	21	0.432	0.55674465	1.515789474	0.13189563
clpP-In2-clpP-Ex2	20	14	0.456	0.913256575	0.97540107	0.40127597
clpP-Ex2-In1	12	24	0.779	0.57237257	2.658703072	1.94E-05
clpP-In1	20	3	0.7415			0.95044075
clpP-In1-Ex1-1	13	12	0.947	0.501070185	3.692007797	1.39E-06
clpP-In1-Ex1-2	24	20	2.877	0.883954225	6.35801105	2.42E-08
psbB-1	12	24	2.7545	0.497163205	10.82318271	1.95E-12
psbB-2	24	24	2.818	0.733535495	7.504660453	4.72E-09
psbB-psbT-1	24	22	1.59	0.747209925	4.156862745	1.63E-10
psbB-psbT-2	24	24	2.1165	1.139861415	3.627249357	3.23E-08
psbH	9	9	2.734	0.87516352	6.102678571	2.27E-04
psbT-psbN-psbH	24	24	2.0785	0.798000665	5.088127295	4.39E-07
psbH-petB-Ex1-In-1	20	9	1.7265	1.94176906	1.736921529	0.0016259
psbH-petB-Ex1-In-2	23	23	2.857	1.04707064	5.330223881	4.70E-07
petB-In	20	20	1.1465	0.61339586	3.651273885	1.78E-05
petB-In-Ex2	23	24	1.277	0.90055889	2.770065076	3.53E-08
petB-Ex2	23	17	1.932	1.44948958	2.603773585	1.00E-07
petB-petD-Ex1-In	24	24	3.3995	1.354745315	4.901946647	1.91E-07
petD-In	23	13	2.253	1.49637334	2.941253264	1.08E-06
petD-In-Ex2	23	23	3.154	0.88297748	6.977876106	3.40E-07
petD-Ex2	24	12	5.609	1.10762883	9.892416226	2.25E-12
petD-Ex2-rpoA-5'UTR	24	24	3.1015	0.38679102	15.66414141	8.60E-08
petD-Ex2-rpoA	24	20	1.4165	0.672977305	4.111756168	1.27E-07
rpoA	24	19	1.1735	0.57627955	3.977966102	2.23E-07
rpoA-rps11	24	24	1.0745	0.635860995	3.301075269	3.68E-09
rps11-rpl36	24	24	0.7725	0.50986089	2.959770115	3.39E-13
rpl36-5'	24	22	0.645	0.684698245	1.840228245	7.90E-06
rpl36-5'UTR-rps8	21	23	0.587	0.60753539	1.887459807	4.29E-04
rps8-rpl14	17	13	0.599	0.94158218	1.242738589	0.56925598
rpl14-rpl16-Ex2	21	12	0.49	0.76772157	1.246819338	0.00133728
rpl16-Ex2-In	20	23	0.4595	0.83414023	1.076112412	0.24970906

Anhang 2

rpl16-In-1	24	23	0.9005	0.90251238	1.949134199	9.43E-04
rpl16-In-2	24	14	1.055	0.966000805	2.13346815	4.58E-07
rpl16-In-Ex1-rps3	17	2	0.479			0.82306541
rps3	24	13	0.8445	1.38502441	1.191114245	0.01625096
rpl22-rps19	21	12	0.92	1.241442895	1.447678993	0.03890259
rpl22-rps19-rpl2-Ex2	22	20	1.2525	1.10372185	2.216814159	1.68E-05
rps19-rpl2-Ex2	12	12	2.369	0.73451224	6.300531915	6.77E-10
rpl2- Ex2-In	24	20	1.8225	0.741349455	4.802371542	4.10E-07
rpl2-In- Ex1	24	24	1.553	0.63293076	4.793209877	2.32E-09
rpl2-In	24	23	1.9515	0.68762848	5.544034091	1.36E-08
rpl2-Ex2-rpl23	24	24	2.101	0.676884285	6.063492063	0
rpl23-trnI(CAU)	24	24	1.839	0.60753539	5.91318328	9.60E-12
trnI(CAU)-ycf2	20	17	0.8355	0.59190747	2.757425743	7.27E-08
ycf2-1	24	22	0.542	0.62316331	1.699059561	2.54E-04
ycf2-2	23	11	0.385	0.55479116	1.355633803	0.01110571
ycf2-3	18	24	0.6965	0.61730284	2.204113924	2.02E-04
ycf2-4	24	13	0.4365	0.56455861	1.510380623	0.99093859
ycf2-5	24	24	0.549	0.59190747	1.811881188	9.88E-05
ycf2-6	10	13	0.963	0.76381459	2.462915601	0.02559069
ycf2-7	14	15	0.806	0.81069835	1.942168675	0.00436059
ycf2-8	23	13	0.341	0.5274423	1.262962963	0.00703455
ycf2-9	24	22	0.386	0.52353532	1.440298507	0.01990125
ycf2-10	24	19	0.5075	0.55674465	1.780701754	1.71E-05
ycf2-ycf15	24	24	0.8465	0.6055819	2.730645161	3.55E-06
ycf15-orf92-orf115	24	22	0.907	0.741349455	2.389986825	5.35E-08
orf92-orf115-trnL	23	24	0.37	0.210000175	3.441860465	1.45E-05
trnL-orf79-ndhB-Ex2	24	12	0.5165	0.401442195	2.513381995	9.43E-06
ndhB-Ex2	20	23	0.5585	0.79116345	1.379012346	0.08849304
ndhB- Ex2-In	12	13	0.671	0.75014016	1.747395833	0.00109851
ndhB-In	3	8		1.35181508		0.86135452
ndhB-In- Ex1	11	23	0.742	0.60167492	2.409090909	0.06676181
ndhB-Ex1	21	23	0.431	0.73451224	1.146276596	0.09420767
ndhB-Ex1-rps7	12	24	0.6085	0.59776794	1.988562092	1.13E-07
rps7-1	23	22	0.496	0.575302805	1.684210526	0.02707037
rps7-2	6	1				-1
rps7- rps12	24	21	0.509	0.49618646	2.003937008	3.90E-07
rps12	12	23	0.6535	0.51962834	2.456766917	2.36E-07
rps12-Ex1-5'UTR	24	22	0.676	0.54111673	2.440433213	1.54E-12
Ig-rps12-orf131 -orf70b	12	24	1.296	0.44148874	5.734513274	1.40E-11
orf131-trnV(GAC)	24	15	1.229	0.76967506	3.11928934	1.27E-05

Anhang 2

trnV(GAC)-rrn16	24	24	5.1275	0.280325815	35.73170732	1.77E-06
rrn16-1	24	24	3.3395	0.210000175	31.06511628	6.93E-06
rrn16-2	24	24	4.2645	0.276418835	30.13780919	3.46E-06
rrn16-3	24	24	3.7245	0.231488565	31.43037975	2.03E-06
rrn16-trnI-Ex1-1	24	15	3.1805	0.20316296	30.58173077	4.98E-09
trnI (GAU)-1	24	24	10.4325	0.434651525	46.88764045	3.93E-10
trnI (GAU)-2	24	13	21.069	1.43190817	28.74351978	0
trnI (GAU)-3	24	23	12.4675	0.68176801	35.7234957	3.51E-10
trnI(GAU)-trnA(UGC)	24	24	7.5195	0.37897706	38.76030928	1.29E-14
trnA(UGC)-Ex1-In	24	23	12.1845	0.34186075	69.62571429	2.44E-15
trnA (UGC)-In	24	23	7.846	0.47469807	32.28806584	5.10E-12
trnA(UGC)-In-Ex2	24	24	9.0945	0.4688376	37.89375	4.00E-15
trnA(UGC)-rrn23-2	2	0				-1
rrn23-1	24	24	0.6125	0.07032564	17.01388889	2.34E-06
rrn23-2	24	21	0.4265	0.05665121	14.70689655	3.87E-07
rrn23-3	24	24	0.408	0.055674465	14.31578947	1.05E-05
rrn23-4	23	24	0.169	0.06446517	5.121212121	8.51E-06
rrn23-5	24	24	0.302	0.047860505	12.32653061	4.72E-06
rrn23-6	24	24	0.379	0.067395405	10.98550725	4.67E-06
rrn23-rrn4.5-1	24	24	0.8305	0.098651245	16.44554455	1.35E-08
rrn23-rrn4.5-2	24	22	1.9195	0.26567464	14.11397059	4.75E-08
rrn23-rrn4.5-3	24	24	2.0355	0.19339551	20.56060606	6.13E-08
rrn23-rrn4.5-rrn5	23	24	1.07	0.17190712	12.15909091	1.92E-08
rrn5-trnR(ACG)	24	24	3.695	0.29888397	24.1503268	4.90E-06
trnR(ACG)-trnN(GUU)-orf75	8	12	5.26	0.784326235	13.10087173	7.05E-07
trnN(GUU)-orf350	24	24	1.5345	0.36334914	8.25	5.86E-07
ndhF-3'-1	12	16	0.531	0.989442685	1.048371175	0.59708254
ndhF-3'-2	23	15	0.869	0.84195419	2.016241299	1.38E-05
ndhF-1	8	21	1.3295	0.78334949	3.315461347	0.00805294
ndhF-2	12	7	1.6655			0.45080653
ndhF-3	1	4				-1
ndhF-rpl32-1	21	3	1.415			0.27076453
ndhF-rpl32-2	14	12	0.7195	0.94353567	1.489648033	0.17395013
rpl32	15	8	0.763	0.82827976	1.799528302	0.03830784
ccsA- 5'UTR	24	22	1.752	0.50595391	6.764478764	7.73E-06
rpl32-sprA/fs24	23	23	0.992	0.58214002	3.32885906	0.01117826
trnL-ccsA-1	24	22	2.546	0.899582145	5.528773073	1.52E-05
trnL- ccsA-2	17	5	1.011			0.0659792

Anhang 2

ccsA-1	18	13	1.5545	0.63488425	4.783076923	1.67E-06
ccsA-2	4	0				-1
ccsA- ndhD	23	21	1.27	0.81069835	3.060240964	4.97E-07
ndhD-1	14	13	0.82	0.68567499	2.336182336	0.01480577
ndhD-2	16	15	0.7425	0.66223311	2.190265487	0.01046951
ndhD- psaC-2	22	18	0.827	0.78334949	2.06234414	2.24E-04
psaC-ndhE	19	23	0.866	0.72669828	2.327956989	0.01373075
ndhE-ndhG-1	7	2				0.41342218
ndhE-ndhG-2	24	22	1.222	0.719861065	3.31614654	7.15E-10
ndhG	24	20	1.2485	0.776512275	3.140880503	3.85E-09
ndhG-ndhI	7	10		0.796047175		0.19874143
ndhI	12	1	1.0335			-1
ndhI-ndhA-1	3	5				0.81203648
ndhI-ndhA-2	3	11		1.14865212		0.22806159
ndhA-Ex2	21	19	1.492	0.84390768	3.453703704	1.47E-11
ndhA-Ex2-In	16	22	0.811	0.66223311	2.392330383	3.31E-05
ndhA-In	14	20	1.0605	0.8400007	2.46627907	8.48E-06
ndhA-In-Ex1-1	15	2	1.296			0.00327624
ndhA-In-Ex1-2	21	4	0.782			0.83727459
ndhA-In-Ex1	23	20	0.734	0.862465835	1.662514156	1.72E-04
ndhA-Ex1-ndhH	14	5	0.7085			0.979911
ndhH-1	18	16	0.6975	0.758930865	1.795366795	0.09203612
ndhH-2	12	14	0.5985	0.755023885	1.54851229	0.37130749
ndhH-rps15	18	9	0.934	1.172094	1.556666667	0.01528884
rps15-ycf1-1	1	14		0.547953945		-1
ycf1	21	22	0.662	0.80483788	1.606796117	0.01072136
rpl2-trnH	24	18	6.764	1.012884565	13.04532305	2.01E-05
aadA	22	4	5.388			8.61E-10

¹ jede Sonde ist mit 12 Replikaten gespottet, Sonden mit weniger als 5 detektierbaren Spots wurden nicht in die Analyse einbezogen

² Median of Ratios der Hintergrund-bereinigten roten (F635) und grünen (F532) Fluoreszenz der RpoA:HA IP

³ Median of Ratios der Hintergrund-bereinigten roten (F635) und grünen (F532) Fluoreszenz der WT IP

⁴ Differenzielle Anreicherung der RpoA:HA IP gegenüber der WT IP, basierend auf den Median of Ratios von roter (F635) und grüner (F532) Fluoreszenz, normalisiert auf alle Signale, die das rpoB Operon repräsentieren

⁵ zweiseitiger, ungepaarter t-Test, Median(Median of Ratios (F635/F532)), wie bei Schmitz-Linneweber *et al.* (2005) beschrieben

Anhang 2

Tabelle 8: RIP-Chip Wertetabelle für die Dunklexperimente zur Identifikation RpoA:HA assoziierter RNAs in Gesamtchloroplastenextrakten. Die graphische Darstellung ist in Abb. 19 zu finden.

Name	Replikate ¹ RpoA:HA	Replikate ¹ WT	Median ("Median of Ratios (635/532)") RpoA:HA ²	Median ("Median of Ratios (635/532)") WT ³	Differenzielle Anreicherung (+HA/-HA) ⁴ Dunkel	p-Wert ⁵
trnH	23	24	0.113	0.07067886	3.592418684	6.47E-06
psbA-3'	19	23	1.79	0.48731214	8.253608015	3.38E-04
psbA-1	20	24	4.4035	0.207386655	47.71063897	5.02E-05
psbA-2	24	24	4.331	0.257605845	37.77726477	9.25E-06
psbA-3	24	14	2.2675	0.47615232	10.70038564	8.05E-05
psbA-trnK	24	24	3.5965	0.2231964	36.20686463	1.07E-05
matK-3'	1	10		0.59333043		-1
matK-1	12	18	0.8355	0.65656941	2.859327153	0.02275377
matK-2	24	17	2.1915	0.56171094	8.766507964	3.74E-06
matK-3	10	16	0.6665	0.659359365	2.271307913	0.06452347
matK-4	23	17	1.575	0.67330914	5.256105663	5.67E-06
matK- 5'UTR	24	22	1.6925	0.523581555	7.263440409	7.12E-06
trnK-5'-1	12	12	0.7925	0.380363865	4.681640465	0.00133917
trnK-5'-2	24	24	1.323	0.3905937	7.610841	1.28E-07
rps16-3'	21	17	0.714	0.71422848	2.246255156	0.0050682
rps16-Ex2-In	13	11	0.422	0.42593313	2.226225066	0.00734
rps16-In						
rps16-5'	20	19	2.982	0.55613103	12.04837706	2.12E-05
Ig-trnQ-3'						
trnQ- psbK	24	24	0.217	0.090208545	5.405179175	1.11E-08
psbK-psbI- trnS	24	23	0.7645	0.48545217	3.538580517	5.51E-07
Ig-trnG- 5'UTR	23	23	1.372	0.46871244	6.57727	1.77E-07
trnG-Ex1-In	24	21	4.4285	0.58589055	16.98393014	6.83E-08
trnG-In	24	10	3.397	0.85744617	8.901982191	1.56E-06
trnG-In-Ex2	24	24	1.2315	0.179487105	15.41697622	7.35E-11
trnG-trnR	24	24	0.551	0.242726085	5.10074	3.61E-12
trnR-atpA	12	8	0.775	0.84070644	2.07135896	0.10877816
atpA-1	8	16	0.5725	0.841636425	1.528442155	0.12634631
atpA-2	18	23	0.614	0.61007016	2.26144811	0.02378888
atpA-atpF	3	3				0.41653858
atpF-Ex2	20	22	0.9075	0.5021919	4.0604575	5.39E-04
atpF-Ex2-In	5	23		0.8369865		0.01193955
atpF-In-Ex1	3	23		0.55055112		0.29460561
atpF-In	2	15		0.70120869		0.06025666
atpF-atpH	14	21	0.4875	0.4649925	2.3557365	0.00655815
atpH	24	24	1.598	0.30317511	11.84353288	2.08E-06
Ig-atpH-atpI	11	16	0.569	0.52265157	2.44623427	0.24347128
atpI	2	15		0.62308995		0.12594929
atpI-rps2- 3'UTR	23	24	1.869	0.43523298	9.649071923	4.89E-04

Anhang 2

rps2-1	12	17	0.4975	0.54125127	2.065343041	0.07889199
rps2-2	10	19	0.471	0.64912953	1.630375272	0.32029455
rps2-rpoC2	6	9		0.4835922		0.88032887
rpoC2-1	24	24	0.571	0.49289205	2.603048943	0.00873237
rpoC2-2	14	13	0.2995	0.44267286	1.520239349	0.16545858
rpoC2-3	17	20	0.393	0.55985097	1.577313987	0.06884494
rpoC2-4	20	22	0.4	0.56171094	1.600092715	0.09953239
rpoC2-5	10	9	0.3505	0.78304737	1.005768492	0.36943693
rpoC2-6	6	16		0.79606716		0.06048687
rpoC2-rpoC1	10	19	0.635	0.69376881	2.056633914	0.17138884
rpoC1-Ex2-In	15	1	0.693			-1
rpoC1-In	7	17		0.42965307		0.28846958
rpoC1-In-Ex1-1	2	5				0.66301675
rpoC1-In-Ex1-2	17	20	0.523	0.590540475	1.989986173	0.07371685
rpoC1-rpoB-1	8	16	0.62	0.50033193	2.784399257	0.04644456
rpoC1-rpoB-2	24	24	0.693	0.733758165	2.122160989	0.00432821
rpoB-1	17	19	0.588	0.69376881	1.904410617	0.09025637
rpoB-2	11	16	0.745	0.571940775	2.92686878	0.00746515
rpoB-3	20	19	0.63	0.65470944	2.162170739	0.01960606
rpoB-5'	14	19	0.4565	0.54311124	1.888643682	0.37319642
lg-rpoB-trnC-1	24	16	1.607	0.6695892	5.39269025	2.46E-05
lg-rpoB-trnC-2	10	3	0.9965			0.96657096
trnC-petN	24	17	0.9155	0.82768665	2.485366483	0.00188978
petN	4	8		0.707718585		0.04610362
petN-psbM	1	4				-1
psbM-5'UTR	1	3				-1
trnD-3'UTR	20	23	0.612	0.42221319	3.256999295	1.24E-05
trnD-trnY-trnE-1	23	24	0.171	0.11345817	3.386556885	2.58E-07
trnD-trnY-trnE-2	24	24	0.306	0.07625877	9.016327317	2.88E-08
trnY-trnE-trnT	24	24	0.2935	0.05021919	13.13216833	4.66E-06
trnE-trnT	24	24	0.3385	0.079048725	9.621922235	1.15E-07
trnT-5'UTR	12	21	0.2965	0.21575652	3.087868578	0.02491801
trnT-psbC	24	24	0.451	0.09857841	10.27999189	3.24E-07
psbD-5'UTR	24	24	3.7825	0.47057241	18.06136275	7.87E-07
psbD-1	24	24	1.8605	0.47057241	8.883850731	8.48E-06
psbD-2	22	11	1.395	0.557991	5.6175255	1.56E-05
psbD-3	24	24	3.0195	0.28271544	23.99846951	2.32E-06
psbD-4	24	23	2.9655	0.24923598	26.73531034	4.94E-06
psbD-psbC	24	24	1.935	0.31061499	13.99769731	5.67E-06
psbC-1	23	24	2.083	0.391523685	11.9544409	4.36E-07
psbC-2	24	24	3.3395	0.33851454	22.16675695	8.04E-07
psbC-3	24	2	2.325			0.8476726
psbC-trnS	24	23	1.879	0.41663328	10.13376576	4.67E-07

Anhang 2

trnS-orf105	24	24	0.5265	0.127407945	9.285384745	5.72E-06
orf105-psbZ	23	20	0.91	0.57845067	3.534867203	2.03E-05
psbZ-trnG-trnfM	24	23	0.8155	0.33293463	5.503804944	2.33E-06
trnfM-rps14	24	24	0.2225	0.071608845	6.981703247	1.52E-08
rps14-psaB-3'UTR	24	19	2.038	0.43523298	10.52156692	8.23E-06
rps14-psaB	24	23	1.1815	0.42593313	6.232902642	1.25E-05
psaB-1	24	22	1.666	0.58217061	6.430174505	5.30E-06
psaB-2	20	17	0.7675	0.64354962	2.67975065	0.02161994
psaB-3	24	13	0.6395	0.54497121	2.63672616	0.01560825
psaB-4	24	24	1.6675	0.445462815	8.411092797	2.80E-05
psaB-psaA	23	20	2.464	0.58961049	9.390171861	1.28E-05
psaA-1	18	21	0.713	0.46871244	3.418071071	0.01754504
psaA-2	13	24	1.038	0.506841825	4.601749211	0.00405383
psaA-3	11	16	1.787	0.551481105	7.281015481	3.98E-04
psaA-5'	24	24	1.7065	0.233426235	16.42686418	6.36E-06
Ig-psaA-ycf3	24	11	0.8425	0.42035322	4.503535288	9.09E-06
ycf3-EX3-In2	4	12		0.845356365		0.63628064
ycf3-In2	14	14	0.597	0.451042725	2.974093979	0.53292953
ycf3-In2-Ex2	1	4				-1
ycf3-In1	18	10	0.5275	0.56171094	2.110122268	0.00424249
ycf3-Ex2-In-Ex1	24	24	0.486	0.439882905	2.482545539	1.00E-05
ycf3-Ex1-orf74	8	12	0.4555	0.37943388	2.697430809	2.63E-04
orf74-trnS(GGA)	24	12	0.4025	0.20087676	4.502297917	7.55E-05
trnS(GGA)-rps4	24	17	1.528	0.4463928	7.691379	9.76E-06
rps4-trnT(UGU)	18	9	0.4475	0.46127256	2.179884375	0.01517595
trnT(UGU)-orf70A	24	22	0.3895	0.116248125	7.52869224	3.11E-08
orf70A-trnL	24	24	2.9555	0.192506895	34.49711	2.62E-08
trnL-1	24	24	0.5125	0.159027435	7.241355263	9.70E-08
trnL-2	24	23	0.392	0.33293463	2.64560581	0.55188928
trnL-In	15	16	3.307	0.618440025	12.01530072	0.0012723
Ig-trnL-ndhJ	1	2				-1
ndhJ	12	14	0.603	0.54311124	2.494747295	0.1655139
ndhJ-ndhK	1	5				-1
ndhK-ndhC	24	20	2.115	0.63982968	7.427523401	2.72E-05
ndhC-5'UTR	23	1	2.33			-1
trnV(UAC)-3'UTR	23	24	1.396	0.56729085	5.529395803	5.50E-06
trnV(UAC)-In	22	18	2.7585	0.77932743	7.953367768	1.94E-06
trnV(UAC)-trnM(CAU)	24	24	1.643	0.162747375	22.68410297	2.71E-09
trnV-trnM-atpE-3'UTR	24	24	5.355	0.29201529	41.20519013	1.06E-07

Anhang 2

trnM(CAU)-atpE	22	21	0.623	0.47243238	2.963100827	8.83E-04
atpE	22	1	2.0105			-1
atpE-atpB	23	24	1.521	0.5207916	6.562408821	5.85E-05
atpB-1	16	0	0.4055			-1
atpB-2	24	24	0.78	0.41663328	4.206672321	2.08E-05
atpB-3	24	2	0.944			0.04196153
atpB-5'UTR	23	9	1.551	0.59891034	5.818995559	1.67E-05
atpB-rbcL-5'UTR	24	24	7.0215	0.5393913	29.24987416	1.26E-05
rbcL-1	24	24	2.955	0.296665215	22.38148495	1.67E-05
rbcL-2	21	23	0.64	0.31061499	4.629729341	0.00807609
rbcL-3	23	24	4.31	0.2975952	32.54238563	2.35E-05
rbcL-4	16	24	0.471	0.326424735	3.242170769	0.00580185
rbcL-5	24	24	2.772	0.237146175	26.26486306	2.58E-05
rbcL-3'UTR	13	12	0.639	0.518001645	2.771837451	1.74E-04
accD-5'	19	12	0.648	0.49289205	2.954073057	0.01369137
accD	1	1				-1
accD-3'-orf71A	19	6	0.523			0.1116176
orf71A-psaI	23	0	0.827			-1
psaI-ycf4	24	23	0.9815	0.53009145	4.160423526	7.41E-05
ycf4-ycf10						
ycf10-1	9	6	0.725			0.51753692
ycf10-2	1	0				-1
ycf10-petA	10	18	0.4145	0.521721585	1.785187219	0.23364524
petA	24	24	1.259	0.41849325	6.7598228	3.44E-06
petA-3'UTR-orf99	12	14	1.0485	0.609140175	3.867668382	0.01648643
orf99-psbJ-psbL	10	14	0.7295	1.105752165	1.482400446	0.35126522
psbL-psbF-psbE	23	22	2.509	0.624019935	9.034419165	1.96E-05
psbE	12	3	1.699			0.00365111
psbE-orf103	19	20	2.14	0.47987226	10.02042558	1.10E-04
orf103-5'	13	2	0.885			0.26851699
lg-orf103-petL	19	20	0.649	0.53753133	2.712932284	0.08285117
petL-petG-trnW(CCA)	24	24	0.182	0.15065757	2.714428889	1.74E-09
petG-trnW(CCA)-trnP(UGG)	24	24	0.5575	0.274345575	4.566095085	1.52E-06
trnP(UGG)-psaJ-1	23	23	0.295	0.09857841	6.724163208	6.54E-05
trnP(UGG)-psaJ-2	24	24	0.168	0.06881889	5.485290811	6.46E-06
psaJ-rpl33	7	0				-1
rpl33-rps18	10	14	0.533	0.575660715	2.080456575	0.1306663
rps18-rpl20	2	0				-1
rpl20-5'UTR	24	11	1.262	0.39431364	7.191435566	1.45E-05
rps12-3'UTR	7	3				0.07835325

Anhang 2

clpP-In2	15	13	0.608	0.34409445	3.97030573	0.13501662
rps12-clpP-In2	24	24	0.5845	0.4463928	2.942153813	5.31E-05
clpP-In2-clpP-Ex2	22	13	0.8015	0.39617361	4.545859648	1.96E-05
clpP-Ex2-In1	2	24		0.49289205		0.30613346
clpP-In1	8	13	1.0855	0.48173223	5.063165965	0.01905605
clpP-In1-Ex1-1	11	2	0.356			0.08959968
clpP-In1-Ex1-2	23	23	0.38	0.24551604	3.477777273	3.33E-05
psbB-1	18	24	0.3125	0.266905695	2.63081446	0.00590904
psbB-2	24	24	1.09	0.235286205	10.40945692	1.54E-05
psbB-psbT-1	23	24	0.675	0.48173223	3.148444981	1.07E-04
psbB-psbT-2	24	24	1.385	0.62494992	4.979693304	3.94E-05
psbH	1	9		0.83326656		-1
psbT-psbN-psbH	24	24	0.735	0.30689505	5.381402727	2.54E-05
psbH-petB-Ex1-In-1	18	2	0.81			0.79982782
psbH-petB-Ex1-In-2	22	24	2.285	0.571940775	8.977040488	3.18E-06
petB-In	21	22	1.329	0.49103208	6.081534205	1.68E-05
petB-In-Ex2	24	24	1.5055	0.41477331	8.155826839	7.59E-06
petB-Ex2	24	24	1.1055	0.41849325	5.9356506	2.85E-05
petB-petD-Ex1-In	24	23	3.2015	0.38501379	18.68423239	1.05E-06
petD-In	23	18	1.023	0.69190884	3.3221925	6.32E-04
petD-In-Ex2	23	24	1.244	0.503121885	5.555782181	7.08E-06
petD-Ex2	22	0	1.5175			-1
petD-Ex2-rpoA-5'UTR	24	24	1.0255	0.2417961	9.529813731	2.42E-07
petD-Ex2-rpoA	12	14	0.68	0.588680505	2.595537441	0.03990037
rpoA	21	17	0.638	0.58961049	2.431383785	0.00235298
rpoA-rps11	19	20	0.58	0.66214932	1.968203933	0.00198799
rps11-rpl36	24	24	1.1805	0.55055112	4.817995389	3.77E-05
rpl36-5'	18	18	0.46	0.65470944	1.578727841	0.12197374
rpl36-5'UTR-rps8	14	16	0.53	0.395243625	3.013068706	0.0186492
rps8-rpl14	15	1	0.942			-1
rpl14-rpl16-Ex2	12	0	0.5265			-1
rpl16-Ex2-In	19	20	0.571	0.56729085	2.261665475	0.01542377
rpl16-In-1	20	16	0.4775	0.354324285	3.028101969	0.0033698
rpl16-In-2	24	15	1.1175	0.35525427	7.068158246	1.64E-05
rpl16-In-Ex1-rps3	14	11	0.5575	0.52823148	2.37147544	0.00239992
rps3	23	13	0.563	0.59147046	2.138815755	9.29E-05
rpl22-rps19	10	1	0.457			-1
rpl22-rps19-rpl2-Ex2	18	17	0.431	0.39803358	2.433075561	0.00553448
rpl2-Ex2-In	24	21	0.4875	0.25853583	4.236936151	0.0014927
rpl2-Ex2-In						

Anhang 2

rpl2-In-Ex1	24	24	1.0165	0.473362365	4.825159745	4.87E-05
rpl2-In	22	24	1.7365	0.49475202	7.886517124	4.18E-05
rpl2-Ex2-rpl23	24	23	1.573	0.52637151	6.714820177	3.42E-05
rpl23-trnI(CAU)	24	21	1.453	0.48731214	6.69971645	3.52E-05
trnI(CAU)-ycf2	24	21	0.525	0.32549475	3.62421	2.43E-04
ycf2-1	15	22	0.387	0.63982968	1.35907875	0.37330549
ycf2-2	22	1	0.381			-1
ycf2-3	13	18	0.324	0.53567136	1.35907875	0.27906302
ycf2-4	17	2	0.342			0.1652014
ycf2-5	21	23	0.348	0.64726956	1.20807	0.09253817
ycf2-6	10	1	0.366			-1
ycf2-7	1	4				-1
ycf2-8	19	1	0.419			-1
ycf2-9	19	24	0.351	0.540321285	1.459664613	0.0875863
ycf2-10	24	24	0.4	0.538461315	1.669181347	0.02773211
ycf2-ycf15	24	24	0.6355	0.80350704	1.777149271	0.02770429
ycf15-orf92-orf115	21	20	0.428	0.603560265	1.593386626	0.00641525
orf92-orf115-trnL	24	24	0.1375	0.09857841	3.134143868	4.02E-05
trnL-orf79-ndhB-Ex2	24	2	0.314			0.1210117
ndhB-Ex2	14	23	0.3565	0.54311124	1.474921079	0.92131958
ndhB-Ex2-In						
ndhB-In	7	11		0.43709295		0.07414003
ndhB-In-Ex1	10	23	0.3475	0.55055112	1.418257855	0.86365467
ndhB-Ex1	22	20	0.508	0.63982968	1.784010349	0.15845486
ndhB-Ex1-rps7	1	21		0.43151304		-1
rps7-1	22	15	0.602	0.34223448	3.952489891	1.51E-04
rps7-2						
rps7-rps12	24	13	0.999	0.32177481	6.97608052	4.55E-05
rps12	1	23		0.4835922		-1
rps12-Ex1-5'UTR	24	20	1.252	0.367344075	7.658246278	1.77E-05
lg-rps12-orf131-orf70b	12	23	0.5695	0.371994	3.439979325	0.12281803
orf131-trnV(GAC)	24	17	0.46	0.38501379	2.6846	8.72E-04
trnV(GAC)-rrn16	24	24	0.5935	0.08369865	15.933101	1.36E-07
rrn16-1	24	24	0.3155	0.05393913	13.14296845	8.87E-06
rrn16-2	24	24	0.48	0.06509895	16.56781714	8.58E-06
rrn16-3	24	24	0.4915	0.05393913	20.47470362	1.24E-05
rrn16-trnI-Ex1-1	24	9	0.5845	0.34223448	3.837591929	0.0047112

Anhang 2

trnI(GAU)-1	24	24	2.3505	0.26411574	19.99696151	4.71E-12
trnI(GAU)-2	24	0	7.0125			-1
trnI(GAU)-3	23	24	2.4	0.397103595	13.58017799	1.62E-07
trnI(GAU)-trnA(UGC)	24	24	1.6895	0.317124885	11.97087545	4.91E-10
trnA(UGC)-Ex1-In	24	24	2.8685	0.23249625	27.72279036	2.31E-09
trnA(UGC)-In	24	21	1.734	0.29945517	13.01113901	4.20E-10
trnA(UGC)-In-Ex2	24	24	1.94	0.19715682	22.10996038	1.66E-09
trnA(UGC)-rrn23-2	3	1				-1
rrn23-1	24	24	0.158	0.03161949	11.22794471	6.98E-06
rrn23-2	24	24	0.1315	0.02603958	11.34722893	5.34E-06
rrn23-3	24	24	0.094	0.02789955	7.570572	9.03E-06
rrn23-4	24	24	0.115	0.02789955	9.26187	5.73E-06
rrn23-5	24	24	0.065	0.02789955	5.23497	1.78E-06
rrn23-6	24	24	0.0885	0.0929985	2.1382839	0.16450185
rrn23-rrn4.5-1	24	24	0.335	0.03905937	19.27159286	1.27E-05
rrn23-rrn4.5-2	24	15	0.5945	0.20831664	6.412478705	0.00134026
rrn23-rrn4.5-3	24	24	0.8195	0.155307495	11.85644749	6.62E-07
rrn23-rrn4.5-rrn5	24	24	0.2985	0.108808245	6.164254615	4.39E-06
rrn5-trnR(ACG)	23	24	0.317	0.149727585	4.757244596	1.49E-08
trnR(ACG)-trnN(GUU)-orf75						
trnN(GUU)-orf350	24	24	0.4505	0.134847825	7.506697034	1.40E-07
ndhF-3'-1	19	10	0.66	0.61193013	2.423483891	0.00103566
ndhF-3'-2	19	14	0.464	0.570080805	1.828856378	0.00753791
ndhF-1	3	17		0.73096821		0.38897488
ndhF-2	1	3				-1
ndhF-3						
ndhF-rpl32-1	18	7	0.556			0.02835402
ndhF-rpl32-2	9	1	0.663			-1
rpl32	14	9	0.8155	0.65284947	2.806783718	0.03747907
ccsA-5'UTR	24	23	0.416	0.25667586	3.641718261	1.53E-04
rpl32-sprA/fs24	10	3	0.547			0.60057066
trnL-ccsA-1	11	12	0.715	0.48917211	3.284296768	0.07509118
trnL-ccsA-2	24	2	0.555			0.47441808
ccsA-1	20	22	1.394	0.53567136	5.847394375	0.00246771
ccsA-2	9	0	0.715			-1
ccsA-ndhD	16	19	0.588	0.58217061	2.269473355	0.03913174
ndhD-1	14	20	0.59	0.78862728	1.681040802	0.05669054
ndhD-2	16	16	0.4965	0.597980355	1.865650871	0.05321176

Anhang 2

ndhD-psaC-2	17	19	0.546	0.73282818	1.674127462	0.42873883
psaC-ndhE	14	18	0.4925	0.696558765	1.588716889	0.1014616
ndhE-ndhG-1	8	11	1.0035	0.26783568	8.418737813	0.00556255
ndhE-ndhG-2	24	23	1.389	0.5207916	5.992890107	2.99E-05
ndhG	19	21	1.402	0.57287076	5.499071883	6.86E-05
ndhG-ndhI	7	8		0.58031064		0.02700874
ndhI	14	12	1.269	0.47615232	5.988440742	0.00482996
ndhI-ndhA-1	10	8	0.8755	0.547761165	3.591393158	0.1353411
ndhI-ndhA-2	1	0				-1
ndhA-Ex2	24	20	1.6275	0.51521169	7.097956408	3.80E-05
ndhA-Ex2-In	14	14	0.407	0.4835922	1.891094192	0.01112983
ndhA-In	7	14		0.480802245		0.0739437
ndhA-In-Ex1-1	8	4	0.6045			0.16797967
ndhA-In-Ex1-2	9	10	0.575	0.51707166	2.498705935	7.13E-04
ndhA-In-Ex1-3	4	1				-1
ndhA-In-Ex1	10	12	0.4255	0.65470944	1.460323253	0.30461253
ndhA-Ex1-ndhH	9	2	0.993			0.23287833
ndhH-1	21	15	0.619	0.46313253	3.003194096	0.00117548
ndhH-2	1	17		0.59333043		-1
ndhH-rps15	15	11	0.557	0.45011274	2.78055781	0.00163887
rps15-ycf1-1	3	14		0.534741375		0.35863106
ycf1	14	13	0.453	0.61937001	1.643410541	0.08411112
rpl2-trnH	24	8	1.682	0.616580055	6.129634208	1.87E-04
aadA	24	6	2.338			5.65E-05

- ¹ jede Sonde ist mit 12 Replikaten gespottet, Sonden mit weniger als 5 detektierbaren Spots wurden nicht in die Analyse einbezogen
- ² Median of Ratios der Hintergrund-bereinigten roten (F635) und grünen (F532) Fluoreszenz der RpoA:HA IP
- ³ Median of Ratios der Hintergrund-bereinigten roten (F635) und grünen (F532) Fluoreszenz der WT IP
- ⁴ Differenzielle Anreicherung der RpoA:HA IP gegenüber der WT IP, basierend auf den Median of Ratios von roter (F635) und grüner (F532) Fluoreszenz, normalisiert auf alle Signale, die das rpoB Operon repräsentieren
- ⁵ zweiseitiger, ungepaarter t-Test, Median(Median of Ratios (F635/F532)), wie bei Schmitz-Linneweber *et al.* (2005) beschrieben

Anhang 2

Tabelle 9: Wertetabelle aus den *Microarray* Analysen für die Identifikation TACI- und TACII-assoziiierter RNA, die in Abbildung 24 und 25 zu finden sind.

Name	ID	Replikate ¹ TACI und preTAC	TACI ² (F635)	preTAC ³ (F532)	TACI (F635)/ preTAC (F532) ⁴	Replikate ¹ TACII und preTAC	TACII ⁵ (F635)	preTAC ⁶ (F532)	TACII (F635)/ preTAC (F532) ⁷
trnH	1	60	7254.6	11520.8	0.63	36	2686.0	5813.9	0.46
psbA-3'	2	56	1666.9	1033.2	1.61	29	873.6	582.4	1.50
psbA-1	3	60	22030.0	12590.5	1.75	36	12016.3	7759.5	1.55
psbA-2	4	59	20539.6	15547.3	1.32	36	13416.2	8098.8	1.66
psbA-3	5	58	9672.8	6614.7	1.46	36	5276.8	2428.2	2.17
psbA-trnK	6	59	21587.9	12017.2	1.80	36	14641.8	7433.3	1.97
matK-3'	7	54	1625.9	573.7	2.83	29	828.4	193.9	4.27
matK-1	8	60	3839.3	1098.9	3.49	33	1322.5	236.0	5.60
matK-2	9	60	16395.1	1499.2	10.94	36	3641.1	530.6	6.86
matK-3	10	52	2089.9	797.2	2.62	26	619.7	161.1	3.85
matK-4	11	59	5197.6	1330.5	3.91	36	2478.3	490.1	5.06
matK-5'UTR	12	59	7960.7	1756.5	4.53	36	3536.0	795.9	4.44
trnK-5'-1	13	57	6271.1	1279.7	4.90	36	3651.0	559.1	6.53
trnK-5'-2	14	60	9920.1	1829.5	5.42	36	4426.2	786.0	5.63
rps16-3'	15	59	2739.5	651.9	4.20	30	1278.9	237.9	5.38
rps16-Ex2-In	16	55	2201.7	740.5	2.97	28	1098.5	259.6	4.23
rps16-In	17	49	2050.1	481.5	4.26	27	706.3	142.2	4.97
rps16-5'	18	54	3932.9	905.9	4.34	28	1952.2	532.7	3.66
Ig-trnQ-3'	19	59	3932.6	964.8	4.08	30	1164.3	233.0	5.00
trnQ-psbK	20	60	5504.8	3742.6	1.47	31	2471.6	2079.4	1.19
trnQ-psbK-psbI	21	23	260.5	195.5	1.33	13	7.3	103.8	0.07
psbK-psbI-trnS	22	60	2132.8	1303.6	1.64	24	596.5	415.6	1.44
Ig-trnG-5'UTR	23	54	5640.8	995.4	5.67	31	2011.2	445.0	4.52
trnG-Ex1-In	24	58	5895.5	2032.4	2.90	35	2055.2	733.6	2.80
trnG-In	25	58	3146.2	1358.4	2.32	30	1363.5	512.7	2.66
trnG-In-Ex2	26	59	6565.2	3151.1	2.08	35	2254.6	2236.5	1.01
trnG-trnR	27	58	2602.5	1510.6	1.72	31	1051.4	646.7	1.63
trnR-atpA	28	57	3533.0	986.9	3.58	36	1507.9	292.3	5.16
atpA-1	29	51	2384.4	507.3	4.70	27	778.8	142.9	5.45
atpA-2	30	56	2491.5	726.7	3.43	26	1295.1	245.1	5.28
atpA-atpF	31	55	2546.7	614.8	4.14	25	786.1	198.3	3.96
atpF-Ex2	32	53	3786.7	933.8	4.06	35	2004.1	428.2	4.68

Anhang 2

atpF-Ex2-In	33	60	6456.3	1353.5	4.77	36	2257.7	423.4	5.33
atpF-In-Ex1	34	58	4409.0	1114.1	3.96	35	2135.5	271.7	7.86
atpF-In	35	55	2639.6	891.3	2.96	30	1054.7	243.8	4.33
atpF-atpH	36	59	2857.6	1096.6	2.61	25	1261.1	342.3	3.68
atpH	37	60	23527.0	2736.9	8.60	36	7908.2	1156.5	6.84
Ig-atpH-atpI	38	56	2303.4	637.8	3.61	27	730.1	155.0	4.71
atpI	39	52	3194.9	761.6	4.20	27	1268.7	201.5	6.30
atpI-rps2-3'UTR	40	59	11974.7	1122.8	10.67	35	3973.6	471.1	8.44
rps2-1	41	59	5284.8	1089.5	4.85	32	2629.2	631.4	4.16
rps2-2	42	59	3278.8	561.0	5.84	22	1300.5	220.1	5.91
rps2-rpoC2	43	56	5364.3	446.7	12.01	35	2647.6	247.9	10.68
rpoC2-1	44	59	5913.9	866.1	6.83	35	4019.3	396.4	10.14
rpoC2-2	45	60	6870.6	649.9	10.57	35	2899.1	289.7	10.01
rpoC2-3	46	53	3054.4	621.9	4.91	27	1169.2	213.4	5.48
rpoC2-4	47	60	5514.5	605.6	9.11	36	3541.2	248.2	14.27
rpoC2-5	48	52	3000.7	451.1	6.65	36	1623.8	93.7	17.33
rpoC2-6	49	56	4674.4	590.5	7.92	33	1758.4	168.7	10.42
rpoC2-rpoC1	50	60	5920.6	738.8	8.01	29	1889.0	148.6	12.71
rpoC1-Ex2-In	51	59	5791.4	720.1	8.04	35	2708.4	317.1	8.54
rpoC1-In	52	56	2865.7	958.8	2.99	24	1007.0	223.5	4.51
rpoC1-In-Ex1-1	53	44	560.6	352.8	1.59	20	236.9	106.9	2.22
rpoC1-In-Ex1-2	54	56	5042.6	783.2	6.44	36	2451.1	220.2	11.13
rpoC1-rpoB-1	55	56	2837.1	605.9	4.68	30	1388.5	335.4	4.14
rpoC1-rpoB-2	56	56	5902.2	676.4	8.73	36	2549.1	255.4	9.98
rpoB-1	57	57	3850.0	529.9	7.27	28	1961.5	203.3	9.65
rpoB-2	58	58	3191.2	640.3	4.98	32	1635.7	218.1	7.50
rpoB-3	59	60	5810.0	1099.0	5.29	36	2337.6	413.4	5.65
rpoB-5'	60	59	5231.6	841.6	6.22	35	1919.9	226.7	8.47
Ig-rpoB-trnC-1	61	57	5186.5	594.5	8.72	28	1685.5	178.2	9.46
Ig-rpoB-trnC-2	62	43	889.7	349.1	2.55	24	345.5	65.8	5.25
trnC-petN	63	58	3256.9	793.8	4.10	30	1585.6	516.0	3.07
petN	64	40	1191.2	213.1	5.59	24	545.0	125.8	4.33
petN-psbM	65	47	2610.8	796.8	3.28	17	178.7	105.8	1.69
psbM	66	43	530.1	377.2	1.41	14	101.5	120.3	0.84
psbM-5'UTR	67	53	1748.5	596.5	2.93	25	436.5	174.1	2.51

Anhang 2

trnD-3'UTR	68	58	4734.6	1007.0	4.70	35	1603.5	516.2	3.11
trnD-trnY-trnE-1	69	59	4169.8	3801.7	1.10	32	2016.2	2917.1	0.69
trnD-trnY-trnE-2	70	60	3165.3	2495.2	1.27	25	1497.8	1968.7	0.76
trnY-trnE-trnT	71	60	8858.0	9428.8	0.94	35	3999.1	8578.8	0.47
trnE-trnT	72	54	3215.3	3251.2	0.99	34	1388.8	2607.8	0.53
trnT-5'UTR	73	58	2418.4	2279.2	1.06	24	818.3	1472.6	0.56
trnT-psbC	74	60	7673.3	6209.4	1.24	36	2300.0	1498.8	1.53
psbD-5'UTR	75	60	23963.9	4342.3	5.52	36	9301.0	2275.6	4.09
psbD-1	76	52	2651.6	912.5	2.91	36	1461.3	334.4	4.37
psbD-2	77	60	10855.1	1445.5	7.51	36	3605.8	690.3	5.22
psbD-3	78	60	11298.8	1565.5	7.22	35	4119.8	802.5	5.13
psbD-4	79	60	17083.5	2123.2	8.05	35	4828.3	1001.6	4.82
psbD-psbC	80	56	4180.0	972.2	4.30	35	2538.1	505.9	5.02
psbC-1	81	56	8817.6	2381.2	3.70	36	4607.7	968.1	4.76
psbC-2	82	60	13370.2	2210.4	6.05	35	7126.1	1103.0	6.46
psbC-3	83	60	9820.8	1433.1	6.85	36	3501.3	499.8	7.01
psbC-trnS	84	56	4975.0	1597.1	3.11	32	1780.8	538.9	3.30
trnS-orf105	85	58	2699.4	2506.9	1.08	25	796.1	1497.2	0.53
orf105-psbZ	86	59	2124.3	828.5	2.56	25	751.7	308.3	2.44
psbZ-trnG-trnfM	87	52	2362.1	836.9	2.82	24	819.8	197.0	4.16
trnfM-rps14	88	60	9073.8	4257.9	2.13	36	5945.6	4763.4	1.25
rps14-psaB-3'UTR	89	60	20988.8	2340.3	8.97	36	13632.5	1365.9	9.98
rps14-psaB	90	57	8161.7	1691.8	4.82	36	3947.9	510.0	7.74
psaB-1	91	60	18931.4	2131.0	8.88	36	10407.9	948.7	10.97
psaB-2	92	60	30613.6	3411.1	8.97	36	5225.1	342.0	15.28
psaB-3	93	59	13808.6	1259.0	10.97	36	5305.8	446.2	11.89
psaB-4	94	60	13522.8	1743.7	7.76	36	8671.9	928.6	9.34
psaB-psaA	95	59	14917.0	995.5	14.98	36	8482.2	514.8	16.48
psaA-1	96	54	3517.9	710.9	4.95	36	2571.7	219.5	11.71
psaA-2	97	59	11833.8	1312.6	9.02	36	5353.1	459.1	11.66
psaA-3	98	56	3427.9	725.1	4.73	35	2110.9	208.6	10.12
psaA-5'	99	59	21265.4	1783.6	11.92	36	12200.0	1157.7	10.54
Ig-psaA-ycf3	100	57	4766.1	772.8	6.17	34	1922.4	311.5	6.17
ycf3-EX3-In2	101	53	2124.6	545.9	3.89	24	806.4	220.6	3.66

Anhang 2

ycf3-ln2	102	59	4342.9	1122.6	3.87	35	2041.1	350.4	5.82
ycf3-ln2-Ex2	103	59	4910.2	1059.4	4.64	35	2153.4	395.0	5.45
ycf3-ln1	104	49	1877.7	332.4	5.65	31	1256.1	99.2	12.66
ycf3-Ex2-ln-Ex1	105	59	9302.1	1044.5	8.91	36	3590.5	510.4	7.04
ycf3-Ex1-orf74	106	55	1985.7	597.4	3.32	26	840.4	232.1	3.62
orf74-trnS (GGA)	107	60	7600.5	4470.8	1.70	35	2929.6	3651.4	0.80
trnS (GGA)-rps4	108	60	6955.3	701.3	9.92	35	2334.9	181.7	12.85
rps4-trnT (UGU)	109	55	3196.9	618.2	5.17	36	1907.4	259.8	7.34
trnT (UGU)-orf70A	110	60	3222.3	3219.1	1.00	26	1157.6	596.5	1.94
orf70A-trnL	111	60	17687.3	4643.7	3.81	36	7377.2	2692.8	2.74
trnL-1	112	60	4273.3	2503.9	1.71	34	2143.3	1543.6	1.39
trnL-2	113	60	4644.4	2454.6	1.89	26	875.6	1107.3	0.79
trnL-ln	114	57	3809.8	1477.5	2.58	34	1109.9	392.0	2.83
lg-trnL-ndhJ	115	60	4025.6	1120.6	3.59	28	1108.9	258.5	4.29
ndhJ	116	60	3038.6	854.0	3.56	24	1148.0	211.8	5.42
ndhJ-ndhK	117	60	5895.3	865.6	6.81	35	1540.2	239.6	6.43
ndhK-ndhC	118	59	5754.4	963.7	5.97	36	2226.6	372.6	5.98
ndhC-5'UTR	119	60	7935.6	1155.0	6.87	32	2391.5	478.9	4.99
trnV (UAC)-3'UTR	120	59	6027.1	1522.5	3.96	29	2482.2	349.8	7.10
trnV (UAC)-ln	121	58	3853.6	1082.2	3.56	24	876.3	300.6	2.92
trnV(UAC)-trnM(CAU)	122	60	8738.7	3667.4	2.38	36	2977.1	2402.9	1.24
trnV-trnM-atpE-3'UTR	123	59	15715.9	2662.5	5.90	36	3712.3	1159.1	3.20
trnM (CAU)-atpE	124	58	2191.5	1054.1	2.08	27	635.6	262.4	2.42
atpE	125	57	4427.9	1378.1	3.21	36	3234.4	657.9	4.92
atpE-atpB	126	60	5528.3	1093.1	5.06	36	3400.3	536.8	6.33
atpB-1	127	57	2961.2	882.1	3.36	36	1459.8	317.2	4.60
atpB-2	128	55	3723.7	1171.2	3.18	36	2490.3	597.6	4.17
atpB-3	129	58	7623.0	1630.6	4.68	36	3677.3	628.4	5.85
atpB-5'UTR	130	57	4443.1	1470.6	3.02	36	2447.7	700.5	3.49

Anhang 2

atpB- rbcL- 5'UTR	131	59	11082.1	10410.0	1.06	35	7022.0	3709.9	1.89
rbcL-1	132	58	43650.2	18219.8	2.40	36	32634.8	12191.1	2.68
rbcL-2	133	53	6310.5	3885.5	1.62	36	4265.7	1806.3	2.36
rbcL-3	134	56	6660.5	4483.7	1.49	36	5043.5	1745.3	2.89
rbcL-4	135	58	9062.8	5244.1	1.73	36	5886.7	2521.8	2.33
rbcL-5	136	59	15722.1	7793.5	2.02	36	13292.2	5133.4	2.59
rbcL- 3'UTR	137	58	3130.9	1801.1	1.74	34	1236.3	546.7	2.26
accD-5'	138	54	3863.7	787.7	4.90	35	2089.4	363.7	5.74
accD	139	60	3643.9	923.4	3.95	36	2037.3	236.7	8.61
accD-3'- orf71A	140	53	3102.7	858.4	3.61	36	1717.8	255.6	6.72
orf71A- psaI	141	60	5271.9	957.3	5.51	36	2119.7	415.2	5.10
psaI-ycf4	142	60	7031.8	1093.4	6.43	36	4034.7	550.4	7.33
ycf4- ycf10	143	53	3497.9	691.1	5.06	31	1038.5	195.0	5.33
ycf10-1	144	57	3645.8	964.1	3.78	34	1843.6	326.1	5.65
ycf10-2	145	37	373.9	546.9	0.68	17	215.3	34.4	6.26
ycf10- petA	146	52	2774.9	687.8	4.03	36	1590.8	159.1	10.00
petA	147	57	4829.7	852.2	5.67	35	2567.0	257.6	9.97
petA- 3'UTR- orf99	148	55	2983.1	635.1	4.70	26	853.3	153.5	5.56
orf99- psbJ- psbL	149	54	1856.5	608.9	3.05	24	617.9	176.3	3.51
psbL- psbF- psbE	150	56	2211.9	806.7	2.74	26	1350.0	308.7	4.37
psbE	151	50	1599.6	632.7	2.53	23	942.8	202.1	4.67
psbE- orf103	152	56	3852.0	1434.3	2.69	32	1102.0	394.3	2.79
orf103-5'	153	59	1809.3	1052.1	1.72	24	607.9	372.2	1.63
lg- orf103- petL	154	60	4352.9	1326.5	3.28	25	940.7	461.1	2.04
petL- petG- trnW (CCA)	155	58	2090.4	1520.7	1.37	24	859.6	613.9	1.40
petG- trnW (CCA)- trnP (UGG)	156	56	5263.0	2601.9	2.02	36	1953.0	1373.8	1.42
trnP (UGG)- psaJ-1	157	60	5422.8	5753.2	0.94	32	1525.8	4262.5	0.36
trnP (UGG)- psaJ-2	158	59	4890.5	5073.9	0.96	33	1227.0	2970.3	0.41
psaJ- rpl33	159	50	2647.7	573.0	4.62	35	625.7	133.0	4.71

Anhang 2

rpl33-rps18	160	57	3394.7	702.2	4.83	36	1286.2	165.3	7.78
rps18-rpl20	161	60	3261.2	910.9	3.58	33	1124.9	195.8	5.74
rpl20-5'UTR	162	60	5321.5	829.0	6.42	34	2170.6	360.6	6.02
rps12-3'UTR	163	59	3287.0	800.5	4.11	35	1328.7	231.3	5.74
clpP-In2	164	60	3196.6	983.2	3.25	30	1162.9	283.4	4.10
rps12-clpP-In2	165	60	5563.2	1063.8	5.23	30	2409.1	627.3	3.84
clpP-In2-clpP-Ex2	166	56	5419.0	765.5	7.08	35	2450.7	312.2	7.85
clpP-Ex2-In1	167	60	4055.1	1124.4	3.61	30	2301.7	668.2	3.44
clpP-In1	168	47	1599.0	392.5	4.07	24	653.3	141.0	4.63
clpP-In1-Ex1-1	169	58	4270.2	851.0	5.02	35	2496.6	401.3	6.22
clpP-In1-Ex1-2	170	58	31392.2	7960.6	3.94	36	11925.4	3557.9	3.35
psbB-1	171	60	10450.0	2176.8	4.80	36	6990.8	1400.6	4.99
psbB-2	172	59	43224.3	9072.2	4.76	36	21527.0	5002.7	4.30
psbB-psbT-1	173	60	7456.8	1834.8	4.06	36	4120.3	886.0	4.65
psbB-psbT-2	174	59	6280.8	1509.7	4.16	36	3933.0	779.3	5.05
psbH	175	56	3770.8	1341.4	2.81	31	2312.3	593.7	3.89
psbT-psbN-psbH	176	60	12293.4	2761.0	4.45	35	7108.9	1460.2	4.87
psbH-petB-Ex1-In-1	177	52	3331.9	1385.2	2.41	35	1399.1	416.4	3.36
psbH-petB-Ex1-In-2	178	60	12926.7	2466.9	5.24	35	7090.1	933.4	7.60
petB-In	179	57	6310.0	1207.3	5.23	36	3135.4	527.4	5.95
petB-In-Ex2	180	59	12115.2	2370.7	5.11	36	5335.0	1227.3	4.35
petB-Ex2	181	57	18559.6	3516.9	5.28	36	10648.5	2619.5	4.07
petB-petD-Ex1-In	182	60	29121.7	4874.3	5.97	36	14600.4	2698.5	5.41
petD-In	183	55	4205.7	1103.0	3.81	35	2642.7	433.3	6.10
petD-In-Ex2	184	54	6669.1	1535.5	4.34	36	3710.3	697.5	5.32
petD-Ex2	185	52	3678.4	1237.7	2.97	35	1772.3	376.6	4.71
petD-Ex2-rpoA-5'UTR	186	60	25983.3	3872.4	6.71	36	10093.2	1759.5	5.74
petD-Ex2-rpoA	187	51	2863.9	537.0	5.33	36	1848.9	207.3	8.92
rpoA	188	56	3732.1	1052.7	3.55	36	2331.0	287.8	8.10
rpoA-rps11	189	55	5881.7	839.8	7.00	36	3252.7	389.3	8.36
rps11-rpl36	190	60	5447.5	992.1	5.49	35	3499.9	407.7	8.59
rpl36-5'	191	60	6398.0	1009.0	6.34	36	3146.0	397.4	7.92

Anhang 2

rpl36-5'UTR-rps8	192	59	4231.2	738.4	5.73	35	2259.5	289.1	7.82
rps8-rpl14	193	58	6844.1	845.4	8.10	36	3374.7	344.1	9.81
rpl14-rpl16-Ex2	194	55	2738.3	673.2	4.07	34	1533.0	122.9	12.47
rpl16-Ex2-In	195	60	4038.8	872.1	4.63	33	2102.7	366.1	5.74
rpl16-In-1	196	60	3809.3	1415.1	2.69	36	2025.2	437.0	4.63
rpl16-In-2	197	60	23550.6	3484.7	6.76	36	6706.4	1305.3	5.14
rpl16-In-Ex1-rps3	198	57	3562.3	832.8	4.28	28	1455.1	251.2	5.79
rps3	199	59	11803.3	1666.5	7.08	35	4569.2	660.0	6.92
rps3-rpl22	200	19	157.7	-28.5		13	66.8	23.7	2.82
rpl22-rps19	201	59	4000.9	778.3	5.14	36	2441.5	383.8	6.36
rpl22-rps19-rpl2-Ex2	202	58	4324.0	1231.9	3.51	36	2423.3	410.5	5.90
rps19-rpl2-Ex2	203	60	6112.9	984.5	6.21	36	2958.0	601.1	4.92
rpl2-Ex2-In	204	60	16850.9	2693.7	6.26	36	9696.0	1458.1	6.65
rpl2-In-Ex1	205	60	10391.1	1399.6	7.42	36	5587.7	725.5	7.70
rpl2-In	206	55	7590.2	1156.9	6.56	36	5371.3	657.4	8.17
rpl2-Ex2-rpl23	207	60	10708.8	1377.7	7.77	36	4896.0	645.6	7.58
rpl23-trnI (CAU)	208	60	4822.2	978.8	4.93	34	2978.2	458.3	6.50
trnI (CAU)-ycf2	209	59	5057.8	2627.0	1.93	30	2698.5	1970.0	1.37
ycf2-1	210	56	4546.0	955.5	4.76	35	2154.2	293.4	7.34
ycf2-2	211	60	8601.6	816.6	10.53	35	3626.3	272.1	13.33
ycf2-3	212	56	4438.0	747.1	5.94	32	1560.3	210.3	7.42
ycf2-4	213	59	6450.7	768.6	8.39	36	2606.1	286.9	9.09
ycf2-5	214	60	6919.7	872.7	7.93	35	2835.9	253.8	11.18
ycf2-6	215	48	4773.2	878.4	5.43	31	1000.0	158.6	6.30
ycf2-7	216	55	2623.3	566.8	4.63	33	943.0	-37.7	
ycf2-8	217	53	5474.2	733.8	7.46	36	2555.4	313.2	8.16
ycf2-9	218	51	3671.8	456.2	8.05	32	2155.5	175.8	12.26
ycf2-10	219	59	10417.2	734.6	14.18	36	4116.8	356.2	11.56
ycf2-ycf15	220	60	5699.2	1092.4	5.22	34	3745.9	473.0	7.92
ycf15-orf92-orf115	221	58	3774.2	729.4	5.17	33	1706.6	290.8	5.87
orf92-orf115-trnL	222	58	5923.4	3083.5	1.92	36	3512.7	1878.0	1.87

Anhang 2

trnL- orf79- ndhB- Ex2	223	60	7775.7	2109.3	3.69	36	2249.9	1006.6	2.24
ndhB- Ex2	224	60	3794.2	878.4	4.32	36	1344.4	196.6	6.84
ndhB- Ex2-In	225	60	5583.7	1073.7	5.20	36	1884.7	216.8	8.69
ndhB-In	226	57	3054.9	912.8	3.35	27	1252.7	172.6	7.26
ndhB-In- Ex1	227	59	7625.5	886.5	8.60	30	2530.5	348.6	7.26
ndhB- Ex1	228	60	4900.6	800.4	6.12	34	2712.2	272.8	9.94
ndhB- Ex1-rps7	229	59	6071.3	792.7	7.66	35	2170.6	336.6	6.45
rps7-1	230	55	3606.1	795.1	4.54	36	2381.8	327.1	7.28
rps7-2	231	53	2646.1	747.4	3.54	32	1006.4	162.0	6.21
rps7- rps12	232	59	6864.2	1077.6	6.37	36	4123.8	509.5	8.09
rps12	233	57	3648.5	643.8	5.67	33	2533.6	402.2	6.30
rps12- Ex1- 5'UTR	234	54	10241.0	1115.8	9.18	35	6236.7	671.6	9.29
lg-rps12- orf131- orf70b	235	52	5932.5	652.3	9.09	36	3607.3	487.0	7.41
orf131- trnV (GAC)	236	58	2147.9	1349.2	1.59	33	2308.6	1114.5	2.07
trnV (GAC)- rrn16	237	60	12827.1	12190.9	1.05	35	12652.7	9636.0	1.31
rrn16-1	238	59	19580.4	20145.5	0.97	36	18621.9	16020.6	1.16
rrn16-2	239	60	26654.5	30556.6	0.87	35	12946.3	11634.1	1.11
rrn16-3	240	60	29524.6	29714.3	0.99	36	20524.5	17147.9	1.20
rrn16- trnI-Ex1- 1	241	59	7613.5	4551.6	1.67	36	5440.7	2445.0	2.23
trnI (GAU)-1	242	59	10818.6	2077.3	5.21	36	7847.9	1372.2	5.72
trnI (GAU)-2	243	59	13679.8	2564.3	5.33	36	10894.7	1769.7	6.16
trnI (GAU)-3	244	56	5692.3	1071.1	5.31	36	3875.5	598.3	6.48
trnI (GAU)- trnA (UGC)	245	60	13705.9	1848.7	7.41	36	5427.9	1023.3	5.30
trnA (UGC)- Ex1-In	246	59	13444.2	1895.1	7.09	36	10332.3	1654.5	6.25
trnA(UG C)-In	247	60	6866.2	1255.6	5.47	36	3163.0	626.0	5.05
trnA (UGC)-In- Ex2	248	60	24200.8	3382.2	7.16	36	17871.9	2906.6	6.15
trnA (UGC)- rrn23-2	249	29	395.4	332.5	1.19	20	249.5	22.1	11.29

Anhang 2

rrn23-1	250	59	20940.2	12495.5	1.68	33	24154.1	8748.0	2.76
rrn23-2	251	60	40499.3	27427.8	1.48	35	44429.6	16294.1	2.73
rrn23-3	252	60	14578.8	11670.7	1.25	36	21858.7	7499.8	2.91
rrn23-4	253	59	23531.9	14599.5	1.61	34	30626.1	9374.2	3.27
rrn23-5	254	60	16321.4	11510.2	1.42	36	21735.9	6945.7	3.13
rrn23-6	255	59	19190.2	12864.5	1.49	36	21315.3	7658.9	2.78
rrn23-rrn4.5-1	256	60	19396.1	12479.9	1.55	36	16674.3	7723.5	2.16
rrn23-rrn4.5-2	257	60	17281.2	11091.3	1.56	36	11975.9	5089.3	2.35
rrn23-rrn4.5-3	258	60	8292.1	4557.4	1.82	36	6336.3	2191.9	2.89
rrn23-rrn4.5-rrn5	259	59	11511.1	7583.3	1.52	35	5904.2	4485.6	1.32
rrn5-trnR (ACG)	260	60	7413.9	4418.3	1.68	34	2150.8	2443.9	0.88
trnR (ACG)-trnN (GUU)-orf75	261	56	3387.7	1160.4	2.92	24	817.1	250.0	3.27
trnN (GUU)-orf350	262	60	7307.7	5315.0	1.37	36	4060.4	3831.4	1.06
ndhF-3'-1	263	60	5795.4	846.3	6.85	26	1106.3	235.4	4.70
ndhF-3'-2	264	55	5387.4	823.7	6.54	33	2177.3	379.8	5.73
ndhF-1	265	60	4293.7	907.6	4.73	24	1111.3	212.9	5.22
ndhF-2	266	42	1276.4	322.5	3.96	22	558.9	167.9	3.33
ndhF-3	267	56	2827.6	541.1	5.23	24	1058.4	227.7	4.65
ndhF-rpl32-1	268	59	2440.1	712.5	3.42	35	1726.0	281.2	6.14
ndhF-rpl32-2	269	58	2251.5	840.9	2.68	30	834.3	234.9	3.55
rpl32	270	55	2375.2	862.9	2.75	25	887.3	367.0	2.42
ccsA-5'UTR	272	59	2278.6	1276.6	1.78	23	878.0	689.7	1.27
rpl32-sprA/fs24	272	111	2376.4	891.0	2.67	51	526.3	244.8	2.15
trnL-ccsA-1	274	58	3001.4	881.0	3.41	28	676.0	148.6	4.55
trnL-ccsA-2	275	59	5283.8	2053.2	2.57	25	1136.5	910.2	1.25
ccsA-1	276	56	3083.7	773.2	3.99	32	1943.2	361.4	5.38
ccsA-2	277	59	3176.3	726.2	4.37	23	858.8	198.2	4.33
ccsA-ndhD	278	60	4185.8	824.0	5.08	36	1541.6	354.7	4.35
ndhD-1	279	58	4831.9	766.9	6.30	30	1200.8	193.1	6.22
ndhD-2	280	51	2456.7	552.9	4.44	27	841.1	198.6	4.23
ndhD-psaC-2	281	53	3136.4	891.6	3.52	24	1202.5	240.8	4.99
psaC-ndhE	282	56	3418.7	835.7	4.09	31	1217.8	322.7	3.77
ndhE-ndhG-1	283	60	6978.4	954.5	7.31	31	2666.1	476.4	5.60
ndhE-ndhG-2	284	60	16464.7	1991.0	8.27	36	7517.1	866.6	8.67

Anhang 2

ndhG	285	59	12649.0	1344.5	9.41	36	5290.2	536.3	9.86
ndhG-ndhl	286	54	1897.0	554.8	3.42	27	550.8	132.8	4.15
ndhl	287	60	12386.2	1393.3	8.89	36	2759.4	361.1	7.64
ndhl-ndhA-1	288	58	4217.6	689.0	6.12	32	1234.2	235.9	5.23
ndhl-ndhA-2	289	59	10448.1	1069.6	9.77	36	3467.1	354.5	9.78
ndhA-Ex2	290	59	15667.5	1735.1	9.03	36	6731.0	791.4	8.51
ndhA-Ex2-In	291	60	5603.5	922.4	6.07	36	2420.6	255.1	9.49
ndhA-In	292	56	4394.0	865.8	5.08	36	2101.7	263.0	7.99
ndhA-In-Ex1-1	293	59	11607.5	1201.0	9.66	36	4657.3	578.0	8.06
ndhA-In-Ex1-2	294	58	1939.2	724.0	2.68	31	1312.0	335.5	3.91
ndhA-In-Ex1-3	295	56	1902.9	421.2	4.52	23	753.0	146.4	5.14
ndhA-In-Ex1	296	57	2241.8	745.0	3.01	24	920.0	235.8	3.90
ndhA-Ex1-ndhH	297	60	4154.1	842.0	4.93	29	1797.6	354.2	5.07
ndhH-1	298	60	4360.2	1372.0	3.18	36	2605.1	758.7	3.43
ndhH-2	299	60	3545.7	1332.2	2.66	31	2019.9	767.4	2.63
ndhH-rps15	300	60	6649.1	944.8	7.04	36	2346.5	267.9	8.76
rps15-ycf1-1	301	60	5840.0	1661.5	3.51	25	1339.4	191.2	7.01
ycf1	302	59	4849.8	978.8	4.95	36	2084.1	273.2	7.63
rpl2-trnH	303	60	17275.2	10362.4	1.67	36	6575.8	4323.0	1.52
aadA	304	54	12251.1	3963.6	3.09	23	912.2	1345.3	0.68
pBluescript	305	25	248.9	222.0	1.12	12	18.7	103.3	0.18
Spike	306	16	331.2	612.9	0.54	13	134.7	35.9	3.75

¹ jede Sonde ist mit 12 Replikaten gespottet, Sonden mit weniger als 10 detektierbaren Spots wurden nicht in die Analyse einbezogen

² Mittelwerte aus TACI-Signalen (F635), die zuvor auf die Summe aller Signale für ein willkürliches Experiment F635 normalisiert wurden

³ Mittelwerte aus preTAC-Signalen (F532), die zuvor auf die Summe aller Signale für ein willkürliches Experiment F532 normalisiert wurden

⁴ Differenzielle Anreicherung von TACI gegenüber preTAC, basierend auf den Mittelwerten von roter (F635) und grüner (F532) Fluoreszenz

⁵ Mittelwerte aus TACII-Signalen (F635), die zuvor auf die Summe aller Signale für ein Experiment F635 normalisiert wurden

⁶ Mittelwerte aus preTAC-Signalen (F532), die zuvor auf die Summe aller Signale für ein willkürliches Experiment F532 normalisiert wurden

⁷ Differenzielle Anreicherung von TACII gegenüber preTAC, basierend auf den Mittelwerten von roter (F635) und grüner (F532) Fluoreszenz

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
<i>Aqua bidest./ A. bidest.</i>	destilliertes Wasser (<i>Aqua bidestillata</i>)
<i>Arabidopsis th.</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
bZip	Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin/ Chloroplast
CAF	CRS assoziierter Faktor
cDNA	durch reverse Transkription erzeugte DNA (<i>complementary DNA</i>)
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
cm	Zentimeter
cpDNA	chloroplastidäre DNA
cpRNP	chloroplastidäres Ribonukleoprotein
CRM	<i>chloroplast RNA splicing and ribosome maturation</i>
CRP	<i>chloroplast RNA processing</i>
CRR	<i>chloroplast respiratory reduction</i>
CRS	<i>chloroplast RNA splicing</i>
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	cultivar
Cy	Cyanin-Farbstoff
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungen

DYW	Domäne in PPR-Proteinen mit AS-Abfolge Asparaginsäure-Tyrosin-Tryptophan
E	<i>extended</i> , Bezeichnung einer Domäne in PPR-Proteinen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
ET1	Etched1
et al.	und andere (<i>et alii, et aliae, et alia</i>)
etc.	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
Ex	Exon
F	Fluoreszenz
F1	Filialgeneration
fw	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm/ Erdanziehungskraft
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HC	schwere Kette des Antikörpers (<i>heavy chain</i>)
HCF	<i>High-chlorophyll fluorescence</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] Piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
His	Histidin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hz	Hertz
IgG	Immunoglobulin G
In	Intron
IP	Immunopräzipitation
IR	<i>inverted repeat</i>
J	Joule
Kap.	Kapitel

Abkürzungen

kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KoAC	Kaliumacetat
KOH	Kaliumhydroxid
L	Linie
l	Liter
LC	leichte Kette des Antikörpers (<i>light chain</i>)
LK	Kontrolllinie
LSC	große Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>large single copy region</i>)
M	Mol (mol/l)/ Membran
min	Minute
mRNA	<u>m</u> essenger RNA
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MeOH	Methanol
MFP	plastidäres DNA-bindendes Protein
MgOAc	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansäure
NaAc	Natriumacetat
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDH	NADH-Dehydrogenase
NEP	kernkodierte plastidäre RNA Polymerase (<i><u>n</u>uclear- encoded plastid RNA <u>p</u>olymerase</i>)
nm	Nanometer
NMP	Nukleotidmonophosphat
nt	Nukleotid
NTP	Nukleotidtriphosphat
ORF	offener Leserahmen (<i><u>o</u>pen <u>r</u>eadin<u>g</u> <u>f</u>ra<u>m</u>e</i>)
P	Promotor/ Phosphat/ Pellet
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

Abkürzungen

PAP	PEP-assoziiertes Protein
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEND	<i>plastid envelope DNA-binding protein</i>
PEP	plastidär kodierte RNA Polymerase (<i>plastid-encoded plastid RNA polymerase</i>)
PetD	Untereinheit des Cytochrom b ₆ f Komplex
PNPase	Polynukleotidphosphorylase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
PPR	Pentatricopeptid-repeat
PQ	Plastoquinon
preTAC	Chloroplastenmembranen vor der TAC Aufreinigung
psi	<i>pound-force per square inch</i>
PSI/ PSII	PhotosystemI /Photosystem II
PSRP	chloroplastidäre ribosomale Proteine
pTAC	plastidäres TAC Protein
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	quantitative PCR
RbcL	Große Untereinheit der RuBisCo
rDNA	ribosomale DNA
rev	<i>reverse</i>
RIP	RNA Immunopräzipitation
RIP-Seq	<i>RIP-Sequencing</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RNP	Ribonukleoprotein
RNR	Ribonuklease
RpoA	alpha Untereinheit der PEP
RpoB	beta Untereinheit der PEP
RpoC1	beta' Untereinheit der PEP
RpoC2	beta'' Untereinheit der PEP
RpoT	Gen der NEP
RpoTm	NEP, die in Mitochondrien lokalisiert

Abkürzungen

RpoTmp	NEP, die in Mitchondrien und Chloroplasten lokalisiert
RpoTp	NEP, die in Chloroplasten lokalisiert
Rps2	ribosomales Protein S2 der kleinen UE des 70S Ribosoms
RNAP	RNA Polymerase
RRM	RNA Erkennungsmotiv (<i><u>R</u>NA <u>r</u>ecognition <u>m</u>otif</i>)
RT	Raumtemperatur / Reverse Transkription / Reverse Transkriptase
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
σ-Faktor	Sigmafaktor
s	Sekunde
s.	siehe
S.	Seite
SD	Shine-Dalgarno Sequenz
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i><u>s</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate</i>)
SIG	Sigmafaktor
Spec	Spectinomycin
SSC	kleine Einzelkopie-Region des Plastoms (<i>small single copy region</i>)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
Str	Stroma
Strep	Streptavidin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAC	transkriptionsaktives Chromosom (<i><u>t</u>ranscriptionally <u>a</u>ctive <u>c</u>hromosome</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-gepufferte Saline Tween 20
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	transfer RNA
U	Uracil/ Uridin/ <i>units</i>
UE	Untereinheit
Ü	Überstand

Abkürzungen

ÜN	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich der RNA (<i>untranslated region</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleich
Vol	Volumen
v/v	<i>volume per volume</i>
W.	Waschung von Membranpellets
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
ycf	hypothetische chloroplastidäre Leserahmen
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Nach Jahren mühevoller Kleinarbeit, ist es geschafft: meine Dissertation liegt vor Ihnen. Damit ist es an der Zeit, einige Danksagungen auszusprechen. Doch will ich mich gleich im Vorfeld bei denjenigen entschuldigen, die ich hier nicht namentlich nennen kann, da das sonst den Rahmen sprengen würde.

Die ersten Dankesworte möchte ich meiner Familie widmen, insbesondere meinen Eltern, Daniela und Andreas, Großeltern und meinem Freund Toyci, die mich in dieser spannenden Phase meiner nun doch schon langen akademischen Laufbahn unermüdlich und tatkräftig unterstützt haben.

Meinem Chef Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber danke ich für die Vergabe dieses spannenden Projekts, die exzellente und immer hilfreiche Betreuung und vor allem für die langjährige Treue. Ohne Ihre Ideen und Ihre Kritik wäre mein Forschungsprojekt niemals soweit gekommen. Christiane (Dr. Kupsch), dir gilt ein besonders herzlicher Dank für die vielen späten Laborstunden die wir zusammen durchgestanden haben, aber auch für deine bereichernden Tipps und Tricks, die mir eine große Hilfe gewesen sind. Marlene, lange schon gekannt, haben wir uns doch erst im Labor kennengelernt und gegenseitig unterstützt. Vielen Dank dafür und dir alles Gute für die kommenden nervenaufreibenden Jahre. Hannes, dir danke ich für die vielen Anregungen und endlosen Diskussionen, die mich oft mitunter in neue thematische Bahnen gelenkt haben. Reimo (Dr. Zoschke) sei gedankt für die kompetente Beratung und die konstruktive Zusammenarbeit. Yujiao danke ich für die vielen chinesischen Leckerein und intensiv Sprachkurse. Prof. Dr. Thomas Börner und Karsten (Dr. Liere) sei für viele Diskussionen gedankt. Julia (Dr. Legen), Denise, Erik, Arne, Jana, Conny, Anne und all den anderen Labor Vier Leuten (heute den Molekularen Genetikern) danke ich vielmals für die Unterstützung und das sehr angenehme Arbeitsklima.

Prof. Dr. Thomas Pfannschmidt und Prof. Dr. Bernhard Grimm bin ich für Ihre Gutachten zu Dank verpflichtet.

Durch die Unterstützung der Frauenförderung des Instituts für Biologie konnte ich erfolgreich mein Forschungsprojekt zum Abschluss bringen, wofür ich mich ebenfalls an dieser Stelle bedanken möchte.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden Sylvi und Jenny bedanken, die mich stets aufbauten und für die notwendige Abwechslung neben der Arbeit sorgten.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich ausdrücklich, gemäß § 7 Absatz 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin (Nr. 17/ 2012), die vorliegende Dissertation eigenständig erarbeitet und verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit war in dieser oder ähnlicher Form nicht schon in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder als ungenügend beurteilt worden. Ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze auch keinen entsprechenden Doktorgrad. Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 30.06.2014

.....

Sabrina Finster